

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КЛЮЧКА ІГОР ВІКТОРОВИЧ

УДК 579.6/8.088.5:661.85-048.32(043.5)


ДИСЕРТАЦІЯ
СИНЕРГІЗМ З ІНШИМИ БІОЦИДАМИ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ В РІЗНИХ
УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMB
AC-5017 ТА *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Галузь знань 16 – Хімічна та біоінженерія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Робота містить результати власних досліджень. Використання текстів,
результатів, ідей інших авторів мають посилання на відповідне літературне
джерело

 Ключка І.В.

Науковий керівник: Пирог Тетяна Павлівна

доктор біологічних наук, професор



Київ - 2024

АНОТАЦІЯ

Ключка І.В. «Синергізм з іншими біоцидами біологічної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241» – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття освітньо-наукового ступеня доктор філософії за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія. – Національний університет харчових технологій Міністерства освіти та науки України, Київ, 2024.

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) володіють широким спектром біологічної активності (антифунгальна та антибактеріальна, антиадгезивна дія, здатність до руйнування біоплівки), що дає можливість розглядати їх як альтернативні антибіотикам та комерційним антифунгальним препаратам природні сполуки. Тим не менше, широке використання таких продуктів мікробного синтезу обмежено рядом причин пов'язаних з використанням дороговартісних субстратів, складних методів виділення цільового продукту і, що найважливіше, впливом умов культивування продуцента на властивості синтезованих метаболітів.

Разом з тим, наявні літературні дані стосуються переважно дослідження впливу різних концентрації джерела вуглецю (здебільшого глюкози) та азоту на концентрацію кінцевого продукту, і лише в поодиноких роботах наявні дані щодо біологічних властивостей ПАР, синтезованих в різних умовах культивування.

Тим не менше, інтерес до таких мікробних метаболітів зростає, досліджуються нові сфери їх використання, в тому числі і у суміші з іншими сполуками. Не виключено, що синергічні властивості поверхнево-активних речовин, отриманих у різних умовах культивування продуцентів, у суміші з іншими біоцидами будуть відрізнятися від властивостей монопрепаратів.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню можливості прояву синергізму біологічної активності (антимікробної, антиадгезивної та ролі у

руйнуванні моно- та двовидових біоплівки) суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих у різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 з комерційними антибіотиками, антифунгальними речовинами та ефірними оліями.

Встановлено, що синтезовані в різних умовах культивування штамів-продуцентів поверхнево-активні речовини проявляють синергізм біологічної активності з різними біоцидами.

Так, ПАР синтезовані *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на гліцерині ріхної якості, проявляли синергічну антимікробну активність з офлоксацином, ципрофлоксацином та ефірною олією чайного дерева щодо *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1. Мінімальні інгібуючі концентрації суміші ПАР з антибіотиками щодо досліджуваних тест-культур становили 0,8-25,5 мкг/мл і були нижчими, ніж встановлені для монопрепаратів антибіотиків (500-2500 мкг/мл) та ПАР 3,2-102,5 мкг/мл. Використання поверхнево-активних речовин у суміші з ефірною олією чайного дерева дало змогу знизити МІК останньої щодо досліджуваних бактерій з 156-625 до 2,4-19,5 мкг/мл.

Незалежно від наявності у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 одновалентних катіонів – активаторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази (ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів, відповідальних за антимікробну активність ПАР), синтезовані ПАР проявляли синергізм антифунгальної активності у суміші з клотримазолом, флуконазолом та знижували МІК антифунгальних препаратів щодо *Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida albicans* Д-6 та *Candida utilis* БМС-65 у 4-32 рази. Використання суміші ефірних олій кориці та лемонграсу з ПАР, синтезованими *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності у середовищі одновалентних катіонів дало змогу знизити МІК ефірних олій щодо досліджуваних дріждів з 156 до 8,5–39 мкг/мл.

За використання поверхнево-активних речовин, синтезованих *R.*

erythropolis ІМВ Ас-5017 як на традиційних субстратах (етанол) та і просмислових відходах (пересмажена соняшникова олія) у суміші з офлоксацином, ципрофлоксацином чи ефірною олією чайного дерева адгезія *Pseudomonas* sp МІ-2, *Enterobacter cloacae* С-8 і *Proteus vulgaris* РА-12 до кахелю та сталі була у 2-2,1 та 2,6-3,1 рази нижчою, ніж після обробки монопрепаратами ПАР, антибіотиків чи ефірної олії.

Деструкції біоплівок бактеріальних *Pseudomonas* sp МІ-2, *Enterobacter cloacae* С-8 і *Proteus vulgaris* РА-12 та дріжджових *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2 та *Candida utilis* БМС-65 біоплівок за дії ПАР, синтезованих штамами ІМВ Ас-5017 та ІМВ В-7241 в різних умовах культивування, у суміші з ефірними оліями, антибіотиками чи антифунгальними препаратами, був 1,9-2,7 та 1,3-3,5 разів вищим порівняно з встановленим для монопрепаратів ПАР, антибіотиків, антифунгальних речовин чи ефірних олій.

Поверхнево-активні речовини, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за наявності у середовищі культивування клітин еукаріотичного (*Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1) індуктора у суміші з офлоксацином, ципрофлоксацином та ефірною олією чайного дерева знижували МІК останніх щодо бактеріальних (*Pseudomonas* sp МІ-2, *E. cloacae* С-8 і *P. vulgaris* РА-12) та дріжджових (*C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2 та *C. utilis* БМС-65) тест-культур у 2,0–40 та 15–960 разів відповідно.

Деструкція двовидових бактеріально-бактеріальних і бактеріально-дріжджових біоплівок за дії комплексу ефірної олії чайного дерева з ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1 була в 1,3–1,8 та 1,2-2,9 разів вищою порівняно із використанням монопрепаратів ПАР чи ефірної олії.

Отже, незалежно від умов культивування, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 поверхнево-активні речовини можуть бути використані у суміші з комерційними антибіотиками, антифунгальними препаратами та ефірними оліями для зниження ефективної

концентрації останніх у боротьбі з патогенними мікроорганізмами здатними до формування біоплівок.

Ключові слова: біосинтез, поверхнево-активні речовини, резистентність, антимікробна та антифунгальна дія, синергізм, біоплівка, індуктор, бактерії, дріжджі.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

Статті у наукових виданнях

1. Pirog, T., Kliuchka, I., Kliuchka L. (2023). Synergism of biological activity a mixture of essential oils and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants, synthesized in the presence of eukaryotic inducer. *Ukrainian Food Journal*, 12(3), 458-472. doi: 10.24263/2304-974X-2023-12-3-11

<https://ufj.nuft.edu.ua/indexpreen.html?doi=10.24263/2304-974X-2023-12-3-11>

«*Ukrainian Food Journal*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 358 від 15.03.2019); міжнародна індексація *Emerging Sources Citation Index* (складова **Web of Science**), **Scopus**.

2. Pirog, T., Kliuchka, I., Kliuchka L. (2022). Antimicrobial activity of a mixture of surfactants produced by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 with antifungal drugs and essential oils. *Ukrainian Food Journal*, 11(1), 176-186. doi: 10.24263/2304-974X-2022-11-1-16

<http://ufj.ho.ua/Archiv/UKRAINIAN%20FOOD%20JOURNAL%202022%20V.11%20Is.1.pdf>

«*Ukrainian Food Journal*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 358 від 15.03.2019); міжнародна індексація *Emerging Sources Citation Index* (складова **Web of Science**), **Scopus**.

3. Pirog, T., Kliuchka, I., Kliuchka L. (2022). Industrial wastes as substrates for synthesis of surfactants with antiadhesive activity by *Rhodococcus erythropolis*

IMV Ac-5017. *Ukrainian Journal of Food Science*, 10 (1), 32-40. doi: 10.24263/2310-1008-2022-10-1-7

<http://ukrfoodscience.ho.ua/Archiv/Ukr%20Jour%20Food%20Sci%20V%2010%20I%201.pdf>

«*Ukrainian Journal of Food Science*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «**Біотехнології та біоінженерія**», категорія Б (Наказ МОН України № 1643 від 28.12.2019); міжнародна індексація EBSCO, Google Scholar, Index Copernicus, Universal Impact Factor, Directory of Open Access Scholarly Resources, CAS Source Index.

4. Пирог, Т.П., Ключка, І.В., Ключка, Л.В. (2022). Вплив інактивованих клітин конкурентних мікроорганізмів на біологічну активність поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. *Наукові праці НУХТ*, 28(2), 24-35. doi: 10.24263/2225-2924-2022-28-2-4

<https://drive.google.com/file/d/1U2IWNgZs2lJMP5KkGX7gq5oaqo6LNCU>

«*Наукові праці Національного університету харчових технологій*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «**Біотехнології та біоінженерія**», категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost*.

5. Пирог, Т. П., Ключка, Л. В., Ключка, І. В., Антонюк, С. І., Бахтій, О. Л., Жалюк, Д. В. (2020). Синергізм антимікробної активності суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 з іншими біоцидними сполуками. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 26 (5), 17-25. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-5-4.

<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/32587>

«*Наукові праці Національного університету харчових технологій*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «**Біотехнології та біоінженерія**», категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost*.

6. Pirog, T.P., Kliuchka, I.V. (2024). Synergism of antimicrobial activity of antibiotics with biocides of natural origin. *Biotechnologia acta* (подано до друку у грудні 2023 р).

«*Biotechnologia acta*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162-Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1714 від 28.12.2016), міжнародна індексація: CrossRef, Google Scholar, Index Copernicus та ін.

Тези доповідей у матеріалах конференцій

1. Kliuchka, I.V. (2023). The use of surface-active substances synthesized by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on industrial waste for the destruction of bacterial and yeast biofilms. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XVII Міжнародної науково-практичної конференції, Київ, Травень 19, 2023, с 45-46.

2. Ключка, І.В., Жалюк, Д.В., Пирог, Т.П. (2023). Роль комплексу антибіотиків та поверхнево-активних речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 у деструкції двовидових біоплівки бактерій. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології: матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фармацевт. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича*, Харків, Україна, Травень 10-11, 2023, с 249-250.

3. Ключка, І., Жалюк, Д., Пирог Т. (2023). Роль у руйнуванні двовидових бактеріальних біоплівки комплексу антибіотиків та поверхнево-активних речовин, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 в різних умовах культивування. *Матеріали 89 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Квітень 3-7, 2023, с 409.

4. Ключка, І.В., Жалюк, Д.В., Пирог, Т.П. (2023). Руйнування двовидових біоплівки за дії комплексу антибіотиків та поверхнево-активних

речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. Матеріали III міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», Харків, Березень 24, 2023, с 206-208.

5. Ключка, І.В., Ключка, Л.В., Пирог, Т.П. (2022). Синергізм антиадгезивної активності комплексу антибіотиків з поверхнево-активними речовинами, синтезованими в різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. Програма та тези матеріалів XI Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції», Київ, Україна, Листопад 8, 2022, с 60-62.

6. Kliuchka, I.V., Pirog, T.P. (2022). Destruction of bacterial and yeast biofilms under the action of surfactants synthesized by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on industrial waste. Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології», Харків, Україна, Жовтень 13, 2022, с 20-22.

7. Kliuchka, I., Pirog, T. (2022) Synergistic effect on *Candida* genus yeast of a mixture of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants with other biocides. Матеріали II міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», Харків, Україна, Травень 20, 2022, с 24-26.

8. Kliuchka, I.; Pirog, T. (2022). Synergistic effect on yeast of a mixture of surfactants *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 with antifungal drugs and essential oils. Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», Київ, Україна, Квітень-Травень, 2022, с 297.

9. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Синергізм антифунгальної дії суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 з антифунгальними препаратами. Програма та тези матеріалів X

Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції», Київ, Україна, Листопад 9-10, 2021, с 54-56.

10. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Деструкція біоплівки за дії комплексу мікробних поверхнево-активних речовин та лікарських засобів. *Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», Київ, Україна, Квітень 23, 2021, с 50.*

11. Ключка, І., Жалюк, Д., Пирог, Т. (2021). Синергічна дія на мікроорганізми поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 та ефірної олії чайного дерева. *Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», Київ, Україна, Квітень 15-16, 2021, с 389.*

12. Ключка, І., Бахтій, О., Пирог, Т. (2021). Антифунгальна активність комплексу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та ефірних олій кориці і лемонграсу. *Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», Київ, Україна, Квітень 15-16, 2021, с 393.*

13. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Руйнування біоплівки за дії суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 та лікарських засобів. *Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», Харків, Україна, Березень 26, 2021, с 131-132.*

14. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Антифунгальна активність суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та ефірних олій. *Матеріали I міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», Харків, Україна, Березень 25, 2021, с 188-189.*

15. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Деструкція біоплівки за дії комплексу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та лікарських препаратів. *Матеріали I міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»*, Харків, Україна, Березень 25, 2021, с 190-191.

16. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Руйнування біоплівки за дії комплексу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та лікарських препаратів. *Матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development»*, Харків, Україна, Березень 18-19, 2021, с 228-229.

17. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Синергізм антифунгальної та антимікробної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 у суміші з ефірними оліями. *Матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development»*, Харків, Україна, Березень 18-19, 2021, с 231-232.

SUMMARY

Kliuchka I.V. “Synergy with other biocides of the biological activity of surfactants synthesized under various cultivation conditions of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241” is a qualified scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree Doctor of Philosophy in specialty 162 Biotechnology and bioengineering. – National University of Food Technologies of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2024.

Microbial surfactants have a wide range of biological activity (antifungal and antibacterial, anti-adhesive action, the ability to destroy biofilms), which makes it possible to consider them as natural compounds alternative to antibiotics and commercial antifungal drugs. However, the widespread use of such microbial synthesis products is limited by a number of reasons related to the use of expensive substrates, complex methods for isolating the target product and, most importantly, the influence of the producer’s cultivation conditions on the properties of the synthesized metabolites.

At the same time, the available literature data mainly concerns the study of the influence of different concentrations of a carbon source (mainly glucose) and nitrogen on the concentration of the final product, and only a few studies contain data on the biological properties of surfactants synthesized under various cultivation conditions.

Nevertheless, interest in such microbial metabolites is growing, and new areas of their use are being explored, including in mixtures with other compounds. It is possible that the synergistic properties of surfactants obtained under different cultivation conditions of producers in a mixture with other biocides will differ from the properties of monopreparations.

The dissertation work is devoted to the study of the possibility of synergism of biological activity (antimicrobial, anti-adhesive and role in the destruction of mono- and two-species biofilms) of a mixture of surfactants synthesized under

various cultivation conditions of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, antifungal substances and essential oils.

It has been established that surfactants synthesized under different cultivation conditions of producer strains exhibit synergistic biological activity with different biocides.

Thus, surfactants synthesized by *R. erythropolis* IMV Ac-5017 on glycerol of various qualities showed synergistic antimicrobial activity with ofloxacin, ciprofloxacin and tea tree essential oil against *Pseudomonas* sp. MI-2, *Escherichia coli* IEM-1, *Staphylococcus aureus* BMS-1. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of a mixture of surfactants and antibiotics against the test cultures were 0.8-25.5 µg/ml and were lower than those established for monopreparations of antibiotics (500-2500 µg/ml) and surfactants 3.2-102.5 µg/ml. The use of surfactants in a mixture with tea tree essential oil made it possible to reduce the MIC of the latter against the studied bacteria from 156-625 to 2.4-19.5 µg/ml.

Regardless of the presence in the cultivation medium of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 of monovalent cations - activators of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase (the key enzyme in the biosynthesis of aminolipids responsible for the antimicrobial activity of surfactants), the synthesized surfactants reduced the MIC of antifungal drugs against *Candida tropicalis* PE-2, *Candida albicans* D-6 and *Candida utilis* BMS-65 by 4-32 times. The use of a mixture of cinnamon and lemongrass essential oils and surfactants synthesized by *A. calcoaceticus* IMV B-7241 in the presence of monovalent cations in the medium made it possible to reduce the MIC of essential oils relative to the yeast under study from 156 to 8.5-39 µg/ml.

When using surfactants synthesized by *R. erythropolis* IMV Ac-5017 on both traditional substrates (ethanol) and industrial waste (overcooked sunflower oil) in a mixture with ofloxacin, ciprofloxacin or tea tree essential oil, adhesion of *Pseudomonas* sp MI-2, *Enterobacter cloacae* C-8 and *Proteus vulgaris* PA-12 to

tiles and steel was 2-2.1 and 2.6-3.1 times lower than after treatment with monosurfactants, antibiotics or essential oils.

Destruction of biofilms of bacterial *Pseudomonas* sp MI-2, *E. cloacae* C-8 and *P. vulgaris* PA-12 and yeast *C.albicans* D-6, *C. tropicalis* PE-2 and *C. utilis* BMC-65 biofilms under the action of surfactants synthesized in various strain cultivation conditions IMV B-7241, mixed with essential oils, antibiotics or antifungal drugs, was 1.9-2.7 and 1.3-3.5 times higher compared to that established for monosurfactants, antibiotics, antifungal substances or essential oils.

Surfactants synthesized by *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017 in the presence of an inducer in the culture medium of eukaryotic (*Saccharomyces cerevisiae* BTM-1) cells in a mixture with ofloxacin, ciprofloxacin and tea tree essential oil reduced the MIC of the latter against bacterial (*Pseudomonas* sp MI-2, *E.cloacae* C-8 and *P. vulgaris* PA-12) and yeast (*C.albicans* D-6, *C. tropicalis* PE-2 and *C. utilis* BMC-65) test cultures 2.0–40 and 15–960 times, respectively.

The destruction of two-species bacterial-bacterial and bacterial-yeast biofilms under the action of a tea tree essential oil complex from surfactants synthesized by *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017 in the presence of *S. cerevisiae* BTM-1 was 1.8 and 1.2 -2.9 times higher compared to the use of monosurfactants or essential oils.

Therefore, regardless of the cultivation conditions, surfactants synthesized by *A. calcoaceticus* IMV B-7241 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017 can be used in a mixture with commercial antibiotics, antifungal drugs and essential oils to reduce the effective concentration of the latter in the fight against microorganisms capable of forming biofilms.

Key words: biosynthesis, surfactants, resistance, antimicrobial and antifungal action, synergism, biofilm, inducer, bacteria, yeast.

ЗМІСТ

ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1. СИНЕРГІЗМ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ КОМПЛЕКСУ АНТИБІОТИКІВ З РІЗНИМИ БІОЦИДАМИ	23
1.1. Вплив комплексу антибіотиків та біоцидів на грампозитивні бактерії	25
1.1.1 Антибіотики та ефірні олії	25
1.1.2. Антибіотики та відмінні від ефірних олій рослинні метаболіти ...	27
1.2. Дія на грамнегативні бактерії суміші антибіотиків та природних антимікробних сполук	30
1.2.1. Антибіотики та ефірні олії	33
1.2.2. Антибіотики та інші природні сполуки	35
1.3. Вплив суміші антибіотиків та антимікробних пептидів на грампозитивні та грамнегативні бактерії.....	37
1.4. Антимікробна дія на мікроорганізми комплексу антибіотиків та поверхнево-активних речовин	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	44
2.1. Об'єкти досліджень.....	44
2.2. Культивування <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 та <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241.....	44
2.3. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин.....	44
2.4. Дослідження біологічної активності поверхнево-активних речовин ...	48
2.4.1. Встановлення мінімальної інгібуючої концентрації поверхнево-активних речовин	48
2.4.2. Дослідження антиадгезивної дії поверхнево-активних речовин ...	48
2.4.3. Визначення ступеня руйнування біоплівки.....	48
2.5. Визначення синергізму антимікробної та антиадгезивної активності комплексу біоцидів	49
2.5.1. Синергічна антимікробна дія на мікроорганізми поверхнево-активних речовин, антибіотиків, антифунгальних препаратів та їх суміші ...	49

2.5.2. Синергізм антимікробної дії суміші поверхнево-активних речовин та ефірних олій	49
2.5.2.1. Визначення фракційної інгібуючої концентрації	49
2.5.3. Визначення синергізму руйнування біоплівки	51
2.6. Визначення синергічної дії суміші біоцидів на одно- та двовидові біоплівки.....	51

РОЗДІЛ 3. СИНЕРГІЗМ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ІМВ Ас-5017 І *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241, СИНТЕЗОВАНИХ В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ, З РІЗНИМИ БІОЦИДАМИ.....

3.1. Антибактеріальна активність комплексу поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 з антибіотиками	54
3.2. Дія на дріжджі роду <i>Candida</i> комплексу поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 з антифунгальними препаратами.....	60
3.3. Синергічна антимікробна активність суміші ефірних олій з поверхнево-активними речовинами <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 і <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241.....	66
Висновки до розділу 3	71

РОЗДІЛ 4. СИНЕРГІЧНА АНТИАДГЕЗИВНА АКТИВНІСТЬ БІОЦИДІВ З ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ІМВ Ас-5017, СИНТЕЗОВАНИМИ В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ.....

4.1. Вплив комплексу антибіотиків з поверхнево-активними речовинами <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 на прикріплення мікроорганізмів до абіотичних поверхонь	72
4.2. Адгезія мікроорганізмів на абіотичних поверхнях, оброблених комплексом поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 з ефірними оліями	78
Висновки до розділу 4	81

РОЗДІЛ 5. ДЕСТРУКЦІЯ БІОПЛІВОК ЗА ДІЇ КОМПЛЕКСУ ПРИРОДНИХ БІОЦИДІВ З ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ІМВ Ас-5017 І <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241, СИНТЕЗОВАНИМИ В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ.....	82
5.1. Руйнування біоплівки під впливом суміші поверхнево-активних речовин з антибіотиками	83
5.2. Деструкція біоплівки дріжджів за дії суміші поверхнево-активних речовин та антифунгальних препаратів	86
5.3. Вплив комплексу ефірних олій з поверхнево-активними речовинами на деструкцію біоплівки	93
Висновки до розділу 5	98
РОЗДІЛ 6. ДІЯ НА ДВОВИДОВІ БІОПЛІВКИ КОМПЛЕКСУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ІМВ Ас-5017 І <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241 З ЕФІРНИМИ ОЛІЯМИ.....	99
6.1. Біологічна активність поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 і <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241, синтезованих за наявності еукаріотичного індуктора у різному фізіологічному стані.....	100
6.2. Роль суміші ефірних олій з поверхнево-активними речовинами <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241, синтезованими за наявності індуктора, у деструкції двовидових біоплівок	104
6.3. Деструкція комбінованих біоплівок за дії комплексу ефірних олій з поверхнево-активними речовинами <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017, синтезованими за наявності еукаріотичного індуктора	109
Висновки до розділу 6	115
ВИСНОВКИ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	118
ДОДАТКИ.....	142

ВСТУП

Актуальність теми. Нині неконтрольоване використання антибіотиків, недотримання терапевтичних доз та нераціональний їх підбір є основними причинами поширення резистентності патогенних мікроорганізмів (Aslam et al., 2018, Bhatnagar et al., 2019; Vano et al., 2023). Комерційні антибіотики і антифунгальні препарати здебільшого не здатні інгібувати мультirezистентні штами, патогенез яких зумовлений в тому числі й здатністю до формування біоплівки (Dong et al., 2019; Breijyeh et al., 2020; El-Baz et al., 2021). Одним з стратегічних підходів до підвищення ефективності антимікробних сполук є використання їх у комбінації з іншими природними речовинами (Cheesman et al., 2017; Coimbra et al., 2020; Di Vito et al., 2023).

Серед таких речовин перспективними є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), яким притаманний широкий спектр біологічних властивостей (антимікробна, антиадгезивна активність та здатність до руйнування біоплівки), що роблять їх потенційними агентами для використання у багатьох галузях промисловості (Chen et al., 2019; Ciurko et al., 2022). Разом з тим, відомо що мікробні ПАР синтезуються у вигляді комплексу вторинних метаболітів, склад і властивості яких можуть змінюватися залежно від умов культивування продуцента, що потрібно враховувати при розробці технології їх практичного використання.

У попередніх дослідженнях було встановлено можливість синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 як на традиційних субстратах (глюкоза, етанол, рідкі парафіни, гексадекан), так і промислових відходах (пересмажена соняшникова олія, відходи виробництва біодизелю) (Пирог, Софилканич, Покора, Шевчук, & Иутинская, 2014; Пирог, Шевчук, Петренко, Палійчук, & Иутинська, 2018) Пізніше, було показано можливість регуляції біологічних властивостей (антимікробної та антиадгезивної) таких метаболітів (Пирог, Никитюк, Макієнко, Шевчук, & Иутинська, 2017; Пирог, Никитюк, & Шевчук, 2017; Пирог, Іванов, & Ярова, 2020; Pirog, & Nikitiuk,

2017) складом поживного середовища (природа джерела вуглецю, наявність біологічних індукторів (Pirog, Kliuchka, Kliuchka, Shevchuk, & Iutynska, 2020; Пирог, Іванов, & Ярова, 2020) підвищення вмісту активаторів та зниження концентрації інгібіторів – ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів (Pirog, Sidor, & Lutsai, 2016) відповідальних за антимикробну активність комплексу синтезованих ПАР. Зазначимо, що у публікаціях про спільне культивування продуцентів практично цінних метаболітів з конкурентними мікроорганізмами або біологічними індукторами зазвичай констатують факт збільшення концентрації цільового продукту, або синтез нових метаболітів і значно менше уваги приділяють біологічній активності утворених сполук (Alves et al., 2019; Caudal et al., 2022; Selegato et al., 2023).

У зв'язку з викладеним вище припустили, що синтезовані в різних умовах культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас–5017 та *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 поверхнево-активні речовини можна використати у комплексі з іншими біоцидними сполуками (ефірними оліями, антибіотиками та антифунгальними засобами), що дасть змогу знизити ефективні концентрації останніх у суміші. Разом з тим не виключено, що синергічні властивості поверхнево-активних речовин, отриманих у різних умовах вирощування продуцентів, у суміші з іншими біоцидами будуть відрізнятися від властивостей монопрепаратів.

У сучасному світі однією із проблем є бактеріальні біоплівки (Ceresa et al., 2021; Vano et al., 2023). Так, за даними ВООЗ 70% внутрішньолікарняних інфекцій пов'язано з утворенням біоплівок на медичному обладнанні, інструментах, катетерах, протезах та імплантах (Pappas et al., 2016). При цьому класичні методи боротьби з біоплівками передбачають використання монопрепаратів антибіотиків, в той час як більшість таких біоплівок є комбінованими (багатовидовими) (Budzyńska et al., 2017; Chevrette et al., 2022), для боротьби з якими доцільним є використання комплексів сполук, що діятимуть як на бактеріальні, так і дріжджові клітини (Buldain et al., 2018; Carbone et al., 2020; Brożyna et al., 2021).

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана на базі кафедри біотехнології та мікробіології Національного університету харчових технологій (НУХТ) згідно плану науково-дослідної роботи кафедри біотехнології і мікробіології «Біотехнологічний потенціал мікроорганізмів природних та техногенних екосистем» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U001485) та проекту МОН України «Комплексні мікробні препарати мультифункціонального призначення: від регуляції біосинтезу та властивостей до перспектив практичного використання» (2019-2021 рр., № 0119U002575).

3. Мета і завдання досліджень.

Мета дисертаційної роботи – дослідити синергізм біологічної активності суміші поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих у різних умовах культивування, з різними біоцидами (ефірними оліями, антибіотиками, антифунгальними засобами).

Основні завдання досліджень:

- дослідити антимікробну та антифунгальну активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на традиційних субстратах та промислових відходах;

- дослідити можливість зниження ефективної концентрації ефірних олій, антибіотиків та антифунгальних засобів у суміші з поверхнево-активними речовинами *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованими в різних умовах культивування;

- встановити можливість синергізму антифунгальної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за різного вмісту у середовищі активаторів та інгібіторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази, у суміші з різними біоцидами;

- встановити можливість синергізму антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у суміші з антибіотиками та ефірними оліями;

- визначити роль у руйнуванні біоплівки суміші поверхнево-активних речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241 з ефірними оліями та антифунгальними препаратами;

- дослідити антимікробну активність суміші антибіотиків та ефірних олій з поверхнево-активними речовинами *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованими за наявності біологічного індуктора у різному фізіологічному стані;

- дослідити вплив фізіологічного стану індуктора у середовищі культивування штамів ІМВ Ас-5017 та ІМВ В-7241 на здатність синтезованих поверхнево-активних речовин проявляти синергізм руйнування двовидових біоплівок у суміші з ефірними оліями.

4. Наукова новизна одержаних результатів.

Встановлено, що незалежно від умов культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезовані поверхнево-активні речовини проявляли синергізм біологічної активності (антибактеріальної, антифунгальної, антиадгезивної дії та ролі у руйнуванні одно- та двовидових біоплівок) у комплексі з антибіотиками, антифунгальними препаратами та ефірними оліями.

Показано, що за наявності ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на різних вуглецевих субстратах у суміші з антибіотиками (офлоксацином та ципрофлоксацином) та ефірною олією чайного дерева спостерігали зниження у 6-43 рази мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) біоцидів щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур порівняно з показниками, встановленими для монопрепаратів.

Поверхнево-активні речовини, синтезовані за наявності у середовищі культивування *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241 активаторів та інгібіторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази, знижували МІК антифунгальних препаратів

(клотримазолу та флуконазолу) та ефірних олій кориці та лемонграсу щодо дріжджів роду *Candida* у 4-32 та 4-18 разів відповідно. При цьому показник фракційної інгібучої концентрації (ФІК) не перевищував 0,5, що вказує на синергізм антимікробної дії.

У разі використання суміші поверхнево-активних речовин, утворених *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезованих як на традиційних (етанол) та і просмислових відходах (пересмажена олія) з антибіотиками чи ефірною олією чайного дерева адгезія тест-культур до абіотичних поверхонь була у 2-2,1 та 2,6-3,1 рази нижчою, ніж після обробки монопрепаратами ПАР, антибіотиків чи ефірної олії.

Ступінь деструкції біоплівки бактеріальних та дріжджових тест-культур за дії ПАР, синтезованих штамами ІМВ Ас-5017 та ІМВ В-7241 в різних умовах культивування, у суміші з ефірними оліями, антибіотиками чи антифунгальними препаратами, був 1,9-2,7 та 1,3-3,5 разів вищим порівняно з встановленим для монопрепаратів ПАР, антифунгальних речовин. антибіотиків чи ефірних олій.

Внесення у середовище вирощування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 як живих, так і інактивованих клітин *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1 супроводжувалося синтезом ПАР з підвищеною антимікробною активністю: МІК щодо тест-культур бактерій та дріжджів були у 2-40 та 15-960 разів нижчими відповідно, ніж мінімальні інгібуючі концентрації ПАР, одержаних на середовищі без індукторів. Незалежно від фізіологічного стану клітин індуктора, синтезовані ПАР проявляли синергізм антимікробної активності у суміші з ефірною олією чайного дерева, показник фракційної інгібучої концентрації при цьому не перевищував 0,5.

Показано, що ПАР, синтезовані за наявності у середовищі культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 клітин еукаріотичного індуктора у суміші з ефірною олією чайного дерева, ефективніше руйнували двовидові бактеріально-бактеріальні та

бактеріально-дріжджові біоплівки: ступінь деструкції біоплівок був в 1,3-2,9 разів вищим порівняно з використанням кожного компоненту окремо.

5. Практичне значення отриманих результатів.

Встановлено, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, проявляли синергізм антибіотеріальної та антифунгальної активності з комерційними антибіотиками, антифунгальними препаратами та ефірними оліями, що дає змогу їх розглядати як комплексні препарати для зовнішнього застосування у ветеринарії, для обробки та дезінфекції приміщень, інвентарю, обладнання у складі мийно-дезінфікуючих засобів.

Збільшення у 1,3-3,5 рази ступеня руйнування біоплівок за дії суміші ПАР, синтезованих у різних умовах культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, порівняно з використанням монопрепаратів дає дає змогу використати такі суміші як перспективні складові «антифунгальних» та «антибактеріальних замків».

Результати наукових досліджень впроваджені у навчальний процес як модулі навчальних дисциплін «Інтенсифікація технологій мікробного синтезу» та «Біотехнологічні студії» для підготовки докторів філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія».

6. Особистий внесок здобувача.

Дисертація є самостійною роботою автора. В рамках підготовки роботи проаналізовано іноземну та вітчизняну літературу з даної проблематики, проведено експериментальні дослідження, узагальнено отримані експериментальні дані та проведено їх порівняльний аналіз з наявними у літературі.

Планування експериментальних робіт, їх аналіз, підготовка публікацій з результатами досліджень проходили за безпосередньої участі наукового керівника д-ра біол. наук, проф. Пирог Т.П.

Визначення синергізму антимікробної та антифунгальної активності поверхнево-активних речовин у комплексі з іншими сполуками, підготовка

проб здійснювалися спільно з здобувачами кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ Жалюк Д. та Бахтій О., які є співавторами публікацій.

7. Список праць за темою дисертації.

За результатами роботи опубліковано 23 наукових праць, у тому числі 5 статей, серед яких 5 – у наукових фахових виданнях України за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія (з яких – 2 статті у журналі бази даних Web of Science та Scopus, категорії «А»); 17 тез доповідей – опублікованих в вітчизняних та закордонних науково-практичних конференціях

9. Структура роботи. Дисертаційна робота складається з вступу, 6 розділів, висновків та списку використаних джерел (161 найменування), 2 додатків. Основний текст викладено на 142 сторінках тексту, який містить 29 таблиць.

РОЗДІЛ 1. СИНЕРГІЗМ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ КОМПЛЕКСУ АНТИБІОТИКІВ З РІЗНИМИ БІОЦИДАМИ

З початку 1990-х років розробка та комерціалізація нових антибіотиків значно сповільнилися (Zaman et al., 2017; Sommer et al., 2017). Так у період з 2017 по 2019 рік Управління з контролю за продуктами й ліками США (FDA) схвалило 11 протимікробних препаратів з яких Європейським агентством з лікарських засобів (EMA) були прийняті лише 4: комбінація меропенем-ваборбактам (Vaborem), еравациклін (Xerava), делафлоксацин (Bahdela/Quofenix) і комбінація іміпенем-циластатин-релебактам (Recarbrio) [<https://www.centerwatch.com/directories/1067-fda-approved-drugs/topic/546-bacterial-infections>].

Така обмежена кількість нових антимікробних сполук пов'язана з появою мультирезистентних бактерій, які через стійкість до більш ніж трьох класів антибіотиків, становлять серйозну загрозу здоров'ю людини (Mlynarczyk-Vonikowska et al., 2022). При цьому, не існує систематичного міжнародного нагляду за поширенням мультирезистентних патогенів, при цьому наявні звіти оцінюють, що щороку в Європі понад 33 000 смертей пов'язані з внутрішньолікарняними та позалікарняними інфекціями, які викликають резистентні штами (Murugaiyan et al., 2022).

У 2017 році, Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) опублікувала список патогенів (ESKAPE), для боротьби з якими терміново потрібні нові антимікробні засоби. У цьому широкому списку збудники *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, та види *Enterobacter* отримали «пріоритетний статус» (Murugaiyan et al., 2022), адже розвинули механізми резистентності до оксазолідинонів, ліпопептидів, макролідів, фторхінолонів, тетрациклінів, β -лактамів, комбінацій β -лактаму та інгібіторів β -лактамази та антибіотиків, які є останньою лінією захисту, включаючи карбапенеми, глікопептиди та поліміксини (Sommer et al., 2017; Naylor et al., 2018; Iguchi et al., 2016; Giddins et al., 2017).

На тлі неефективності «класичного» підходу боротьби зі збудниками інфекційних захворювань, все інтенсивніше розвивається новий напрямок комбінованої (синергічної) дії, що передбачає використання антибіотиків з іншими антимікробними речовинами, зокрема природнього походження.

У цьому огляді представлено літературні дані останніх років щодо синергізму антимікробної активності антибіотиків та ефірних олій, антибіотиків та відмінних від ефірних олій природних сполук, антибіотиків та антимікробних пептидів та поверхнево-активних речовин щодо грампозитивних (метицилінрезистентних штамів *Staphylococcus aureus*) та грамнегативних збудників інфекційних захворювань.

1.1. Вплив комплексу антибіотиків та біоцидів на грампозитивні бактерії

Staphylococcus aureus є основною причиною як нозокомінальних, так і позалікарняних інфекцій людей у всьому світі. Цей умовно-патогенний мікроорганізм може викликати численні гострі та хронічні інфекції шкіри, смертельну пневмонія, сепсис, менінгіт, ендокардит або синдром токсичного шоку (Singh et al., 2019). При цьому, збільшення поширеності таких інфекцій, супутні ускладнення та збільшену смертність пов'язують саме з метицилінрезистентними (MRSA) штамми золотистого стафілокока (Coimbra et al., 2022). Останні здатні до синтезу альтернативних пеніцилінзв'язуючих білків (PBP), з низькою спорідненістю до пеніциліну, що забезпечує їх широку стійкість до «традиційних» методів лікування.

1.1.1 Антибіотики та ефірні олії.

На ряду зі збільшенням кількості публікацій щодо поширення таких стійких штамів та вивченням механізмів їх резистентності (Singh et al., 2019; Coimbra et al., 2022; Mlynarczyk-Bonikowska et al., 2022), з'являється все більше досліджень альтернативних стратегії та молекул (зокрема природного походження) для боротьби з резистентними штамми *S. aureus*.

У таблиці 1.1 наведено дані щодо синергізму антимікробної активності ефірних олій (ЕО) та антибіотиків (АБ) щодо метицилінрезистентних штамів

S. aureus. Так у роботі (Lahmar et al., 2017) було встановлено, що у разі використання ефірних олій мастикового дерева та пітуратосу зеленого у комбінації з тетрацикліном та амоксициліном щодо *S. aureus* SARM753, дозволило знизити мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) антибіотиків з 16-32 мкг/мл до 2-12 мкг/мл. Значне зниження МІК (у 32-64 рази) антибіотиків офлоксацину та оксаліцину спостерігали і у разі використання ЕО, одержаної з самосилу галузистого щодо штаму SARM760. Такий ефект дослідники пов'язують з компонентним складом ефірних олій, багатих на лімолен, терпен-4-ол, β -еудисмол. Останній, є основним компонентом, що входить лише до складу самосилу галузистого, що можливо і пояснює значно нижчі показники МІК антибіотиків у суміші з цією ефірною олією.

У опублікованому раніше огляді (Pirog et al., 2019) ми акцентували увагу, що одним з основних методів встановлення синергізму є розрахунок фракційної інгібуючої концентрації (ФІК), при цьому значення $ФІК \leq 0,5$ вказує на синергізм між сполуками. Так, у роботі (Buldain et al., 2018) досліджували можливість використання ефірної олії чайного дерева та рифаксиміну (дослідження проводили при різних рН (7,4, 6,5 та 5,0) для імітації позаклітинних та внутрішньоклітинних умов) щодо 4-х штамів *S. aureus*. Однак синергізм антимікробної активності (значення ФІК становило 0,37, при рН 6,5) був встановлений лише для одного штаму (див табл. 1.1), тоді як для трьох інших ФІК перевищувало показник 0,5, що вказувало на адитивний ефект такої суміші щодо досліджуваних тест-культур (Buldain et al., 2018).

Використання суміші антибіотиків та ефірних олій, дозволяє не лише знизити МІК антибіотику, а самої олії. У роботі (Araújo Silva et al., 2016) було встановлено синергізм антимікробної активності ($ФІК \leq 0,06$) суміші іміпінему та ЕО базиліку щодо штамів золотистого стафілокока, при цьому МІК останнього вдалося знизити у 32 рази по відношенню до обох тест-культур (табл.1.1). Варто зазначити, що окрім імідопірану синергізм визначали ще й для суміші ЕО та ципрофлоксацину, при цьому для обох

тест-культур встановлено антагонізм взаємодії таких сполук (Araújo Silva et al., 2016).

Перспективними для боротьби з метицилінрезистентними штамми золотистого стафілокока є комбінації ефірної олії кмину з ципрофлоксацином та амоксицикліном (Grădinaru et al., 2018), м'яти перцевої з ампіциліном та гентаміцином (Rosato et al., 2018), кориці з аміциліном та левомецитіном (El Atki et al., 2019), пеларгонії з ципрофлоксацином (Malik et al., 2011) та норфлоксацином (Rosato et al., 2007), чеберу з гентаміцином (Vitanza et al., 2019), кротону з оксациліном та ампіциліном (Oliveira et al., 2022) про що свідчить показник ФІК (табл. 1). Варто зазначити, що в більшості вищенаведених праць, дослідники позитивний ефект використання суміші антибіотиків та ефірних олій пов'язують зі здатністю основних їх компонентів (терпенів, фенолів, спиртів тощо), спричиняти пошкодження клітинної мембрани з екстравазацією внутрішньоклітинного вмісту (Vitanza et al., 2019; Oliveira et al., 2022) та зазначають що комбіноване використання ефірних олій з сучасними протимікробними препаратами є більш ефективним у порівнянні з монотерапевтичним лікуванням, і дасть змогу знизити побічні ефекти та дозу препарату.

1.1.2. Антибіотики та відмінні від ефірних олій рослинні метаболіти.

На ряду з ефірними оліями, інші речовини рослинного походження (Mun et al., 2013; Lee et al., 2010; Joung et al., 2012; Kang et al., 2011; Joung et al., 2015; Joung et al., 2016; Mun et al., 2015; Pereira et al., 2016; Yu et al., 2005) за рахунок вмісту у них алкалоїдів, сіркоорганічних та фенольних сполуки, кумаринів і терпенів є перспективним антимікробними засобами. Завдяки різноманітному складу таких сполук механізм їх дії на патогени (в тому числі і мультирезистентні штами) включає інгібування синтезу клітинної стінки, інгібування фізіології бактерій, модуляцію чутливості до антибіотиків, інгібування біоплівки, ослаблення бактеріальної вірулентності та інгібування ефлюкських насосів (Murugaiyan et al., 2022), що робить їх також і перспективними для використання у суміші з антибіотиками.

Таблиця 1.1

Антимікробна дія суміші ефірних олій з антибіотиками на штами *Staphylococcus aureus*

Ефірна олія, ЕО (джерело отримання)	Антибіотик	Штам <i>Staphylococcus aureus</i>	МІК ЕО, мкг/мл	МІК АБ мкг/мл	МІК компонентів у суміші, мкг/мл			література
					ЕО	АБ	ФІК	
<i>Pistacia lentiscus</i> (Мастикове дерево)	тетрациклін	SARM753	0,12 мг/мл	32	-	12	-	Lahmar et al., 2017
	амоксицилін				-	4	-	
<i>Pituranthos chloranthus</i> (Пітуратос зелений)	тетрациклін	SARM753	0,25 мг/мл	32	-	4	-	
	амоксицилін				-	2	-	
<i>Teucrium ramosissimum</i> (Самосил галузистий)	офлоксацин	SARM760	1 мг/мл	128		4	-	
	оксаліцин				-	2	-	
<i>Melaleuca armillaris</i> (Чайне дерево)	клоксацилін	ATCC 29213	24 (мкл/мл)	0,061	0,05 (мкл/мл)	0,006	0,36	Buldain et al., 2018
<i>Ocimum basilicum</i> (Базилік духмянний)	іміпінем	ATCC 6538	1024	4	32	0,125	0,06	Araújo Silva et al., 2016
		M 177						
<i>Carum carvi</i> L (Кмин звичайний)	ципрофлоксацин	ATCC 25923	4	0,5	-	-	0,37	Grădinaru et al., 2018
	амоксициклін			2	-	-	0,37	
<i>Mentha piperita</i> (М'ята перцева)	ампіцилін	ATCC 6538	9,1	0,1	1,82	0,03	0,44	Rosato et al., 2018
	гентаміцин	ATCC 6538	9,1	2	0,91	0,06	0,11	
		ATCC 4330	9,1	8	0,45	2,0	0,3	
<i>Cinnamomic cassia</i> (Кориця китайська)	левоміцетин	ATCC 25923	4,88	0,32	1,22	0,07	0,5	El Atki et al., 2019
	ампіцилін			0,16	0,61	0,04	0,38	
<i>Pelargonium graveolens</i> (Пелагонія духмяна)	ципрофлоксацин	ST2	8,96	16	-	-	0,38	Malik et al., 2011
	норфлоксацин	ATCC 6532	720	0,5	-	0,6	0,37	Rosato et al., 2007
<i>Satureja montana</i> (Чабер гірський)	гентаміцин	ATCC 25923	0,78	0,5	0,19	0,06	0,36	Vitanza et al., 2019
		P6528	0,39	0,5	0,1	0,03	0,31	
<i>Croton conduplicatus</i> (Кротон, хінне дерево)	оксацилін	ATCC 25923	256	2	16	0,5	0,31	Oliveira et al., 2022
		ATCC 33591	512	32	32	1,0	0,09	
	ампіцилін	ATCC 25923	256	2	16	0,25	0,18	
		ATCC 33591	512	16	32	0,5	0,09	

Примітка: «-» дані не наведено

Так, куркумін – натуральний поліфенольний алкалоїд отриманий з *Curcuma longa Linné* зазвичай використовують як приправу та барвник у харчовій промисловості. Тим не менше, у суміші з ампіциліном, ципрофлоксацином та норфлоксацином він проявляє синергізм антиміробної активності щодо штамів золотистого стафілокока: ФІК не перевищував 0,5, а МІК антибіотиків, у суміші з куркуміном, вдалося знизити з 3,9-62,5 мкг/мл до 0,97-7,8 мкг/мл (табл.2) (Mun et al., 2013).

Встановлено, що рослина може містити декілька речовин, що проявляють антимікробну властивість. До таких належать емодин та рейн, отримані з листя рослини *Rheum palmatum*. За хімічним складом вони є похідним антрахінону, проявляють широкий спектр біологічних властивостей (протипухлинна, протизапальна), та можуть бути використані у комбінації з антибіотиками (Lee et al., 2010; Joung et al., 2012). Так, використання емодину з ампіциліном та рейну як з ампіциліном так і оксацикліном, дозволила знизити у 4 та 4-16 разів відповідно МІК антибіотиків щодо метицилінрезистентних штамів *S. aureus* (табл 2.1).

Синергізм антимікробної активності у суміші з антибіотиками також був показний для таких рослинних біоцидів як лютеолін, ресвератол, салімарин/сілібінін, морін, полікапрол та барберін (табл.2.1) (Kang et al., 2011; Joung et al., 2015; Joung et al., 2016; Mun et al., 2015; Pereira et al., 2016; Yu et al., 2005) Морін є флаваїдом рослинного походження, та у комбінації з β -лактамними антибіотиками (ампіциліном та оксацикліном) є ефективним антимікробним агентамо щодо штамів *S. aureus*, значення фракційної інгібуючої концентрації не перевищувало 0,5 (табл 2.1). Встановлено, що морін інгібує експресію пеніцилінзв'язуючого білка, за рахунок цього стійкі штами стають більш чутливими, окрім цього цей природний біоцид діє на цитоплазматичну мембрану викликаючи зміни в клітині в цілому (Mun et al., 2015).

Аналогічні властивості проявляє і полікапрол – біоцид, виділений з *Cleistochlamys kirkii (Benth) Oliv* африканської лікарської рослини. Так, в

комбінації з β-лактамами антибіотиками полікарпол (МІК 125-250 мкг/мл) проявляв синергічний ефект щодо штамів золотистого стафілокока, при цьому МІК оксикліну вдалося знизити з 125 мкг/мл до 1,5 мкг/мл, а для амоксицикліну – з 250 до 7,5 мкг/мл.

Tanreqing отриманий з суміші рослин *Xiong Dan ma Shan Yang, JiaHuang Qin, Jin Yin Hua, Lian Qiao* та являє собою суміш більше 50 різних складових, зокрема, флавоноїдів, фенольних та холевих кислот, амінокислот (Yang et al., 2018). Даний природний комплекс активно використовується у східній медицині для лікування інфекційних захворювань верхніх дихальних шляхів, хоча метаболізм та механізм його дії до кінця не вивчений.

Tanreqing у суміші з ліназолідом знижував МІК щодо *S. aureus* ATCC 43300 останнього з 2,5 до 1,25 мкг/мл, хоча показник ФІК ($\leq 0,5$) вказував лише на часткову синергію (Yang et al., 2018)

Отже, окрім ефірних олій, інші рослинні сполуки, багаті на феноли, алкалоїди, терпени, є перспективними для комбінації з антибіотиками з метою посилення дії останніх на метицилінрезистентні штами золотистого стафілокока

1.2. Дія на грамнегативні бактерії суміші антибіотиків та природних антимікробних сполук

Резистентні грамнегативні бактерії є однією з проблем сучасної медицини, адже є відповідальним за більшість випадків пневмонії, інфекцій кровотоку (здебільшого пов'язаних із застосуванням катетера), та іншого сепсису, набутого у відділенні інтенсивної терапії, наприклад інфекції сечовивідних шляхів (Breijyeh et al., 2020).

При цьому механізм антимікробної резистентності виникає внаслідок експресії ферментів, що інактивують антибіотики, і неферментативних шляхів, що може бути наслідком підвищення внутрішньої резистентності через мутації в хромосомних генах (таких як збільшення експресії ферментів,

Таблиця 2.1

Антибактеріальна активність суміші рослинних біоцидів з антибіотиками щодо штамів *Staphylococcus aureus*

Рослинний біоцид (природа)	Антибіотик	Штам тест- культури	МІК рослинного біоциду, мкг/мл	МІК АБ, мкг/мл	МІК компонентів у суміші, мкг/мл			Література
					біоциду	АБ	ФІК	
Куркумін (поліфенольний алкалоїд)	ампіцилін	ATCC 25923	250	31,2	31,2	1,25	0,18	Mun et al., 2013
	ципрофлоксацин	DPS-1		3,9	62,5	0,97	0,5	
		ATCC 33591		62,5	62,5	7,8	0,38	
	норфлоксацин	DPS-1		31,2	31,2	0,9	0,25	
		ATCC 33591	250	62,5	15,6	0,31		
Емодин (похідне антрахінону)	ампіцилін	ATCC 25923	25	0,9	6,2	0,2	0,5	Lee et al., 2010
		ATCC 33591	25	62,5	6,2	15,6	0,5	
Рейн (похідне антрахінону)	ампіцилін	ATCC 33591	15,6	1000	0,97	250	0,3	Joung et al., 2012
		ATCC 25923		7,8	3,5	7,8	0,5	
	оксацилін	ATCC 25923		7,8	1,9	1,9	0,37	
		DPS-2		500	3,9	125	0,5	
		ATCC 33591		250	1,9	15,6	0,18	
Сибілінін (алкалоїд)	ампіцилін	ATCC 25923	4	2	2	0,5	0,5	Kang et al., 2011
	оксацилін	ATCC 33591	8	8	1	2	0,5	
		ATCC 25923	4	1024	1	256	0,5	
Ресвератрол (антиоксидант)	ампіцилін	ATCC 25923	125	31,25	15,6	1,9	0,19	Joung et al., 2015
	оксацилін			125	15,6	7,8	0,19	
	гентаміцин			62,5	31,2	7,8	0,38	
	ципрофлоксацин			31,2	15,6	3,9	0,25	
				ATCC 33591	500	31,2	62,5	
	ванкоміцин			ATCC 33591	1,9	31,2	0,24	
DPS-2		3,9	31,2	0,9	0,5			

Примітка: «—» дані не наведено

Закінчення таблиці 2

Рослинний біоцид (природа)	Антибіотик	Штам тест- культури	МІК рослинного біоциду, мкг/мл	МІК АБ, мкг/мл	МІК компонентів у суміші, мкг/мл			Література
					біоциду	АБ	ФІК	
Лютеолін (поліфенольний алкалоїд)	ампіцилін	DPS-1	62,5	1000	3,9	62,5	0,13	Joung et al., 2016
		DPS-2		1000	3,9	62,5	0,13	
	оксацилін	ATCC 25923		62,5	3,9	3,9	0,13	
		ATCC 33591		500	3,9	31,3	0,13	
		DPS-2		500	3,9	31,3	0,13	
	гентаміцин	ATCC 25923		62,5	3,9	3,9	0,13	
		ATCC 33591		62,5	3,9	3,9	0,13	
Морин (флаваноїд)	ампіцилін	DPS-1	125	15,6	7,8	3,9	0,28	Mun et al., 2015
		DPS-2	250	195	62,5	0,24	0,37	
		ATCC 33591	500	1000	31,25	250	0,31	
	оксацилін	DPS-4	250	500	62,5	125	0,5	
Полікарпол (флаванон)	амоксицилін	ATCC 9144	125	250	30	7,5	0,18	Pereira et al., 2016
	оксацилін		125	125	30	1,5	0,11	
Берберін (алкалоїд)	оксацилін	OMS 7	65	16	16	4	0,5	Yu et al., 2005
Тапгецінг (суміш флавоноїдів, фенольних та холових кислот, амінокислот)	лінезолід	ATCC 43300	4125	25	2063	1,25	0,5	Yang et al., 2018

що інактивують антибіотики, ефлюксні насоси, проникність або цільові модифікації) або отримані шляхом перенесення мобільних генетичних елементів (плазмід), що несуть гени резистентності (Jean et al., 2022).

На тлі збільшення резистентності таких патогенів, у літературі з'являється все більше повідомлень про ефективне використання суміші антибіотиків з різноманітними рослинними сполуками, в тому числі і ефірними оліями (табл. 3.1) та відмінними від ефірних олій природними біоцидами (табл. 4.1).

1.2.1. Антибіотики та ефірні олії. За рахунок наявності у складі лімолену, себініну терпен-4-олу ефірна олія одержана з *Pituranthos chloranthus*, окрім дії на метицилінрезистентних стафілококів (див. вище) проявляє високу антимікробну активність (МІК становить 1 мкг/мл), щодо кишкової палички, та знижує, при використанні в суміші, мінімальну інгібуючу концентрацію антибіотиків амоксицикліну та оксикліну, з 1024 до 60 та 260 мкг/мл відповідно (Lahmar et al., 2017).

Ефірна олія базиліку духмяного (Araújo Silva et al., 2016) та кмину звичайного (Grădinaru et al., 2018) проявляють синергічний ефект у суміші з антибіотиками (табл. 3.1) щодо представників роду *Pseudomonas*. При цьому значення ФІК не перевищувало 0,5, що вказує на синергізм дії такої суміші.

Антимікробну активність щодо *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 та *Klebsiella pneumoniae* ATCC 19833 проявляє і суміш ефірної олії м'яти перцевої з антибіотиками (табл. 3.1). Зокрема, значення фракційної інгібуючої концентрації суміші ефірної олії з гентаміцином та/або ампіциліном щодо штамів грамнегативних бактерій не перевищувало 0,5, що вказує на синергізм дії цих сполук (Rosato et al., 2018).

У роботі (El Atki et al., 2019) показано можливість використання суміші стрептоміцину з ефірною олією кориці щодо представників роду *Pseudomonas* та *Escherichia*, що дало змогу знизити удвічі як МІК антибіотику, так і самої ефірної олії (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Антибактеріальна активність суміші ефірних олій з антибіотиками щодо грамнегативних бактерій

Ефірна олія, ЕО (джерело отримання)	Антибіотик (АБ)	Тест-культура	МІК ефірної олії, мкг/мл	МІК антибіотику, мкг/мл	МІК компонентів у суміші, мкг/мл			Літера- тура
					ЕО	АБ	ФІК	
<i>Carum carvi</i> L (Кмин звичайний)	ципрофло- ксацин	<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 27853	15	1	-	-	0,37	Grădinaru et al., 2018
<i>Pituranthos chloranthus</i> (Пітуратос зелений)	оксациклін	<i>Escherichia coli</i>	1	>1024	-	60	-	Lahmar et al., 2017
	амоксициклін		1	1024	-	260	-	
<i>Ocimum basilicum</i> (Базилік духмяний)	іміпенем	<i>Pseudomonas aureginosa</i> 1662339	1024	4	32	0,12	0,06	Araújo Silva et al., 2016
	ципрофло- ксацин			2	32	0,12	0,09	
<i>Mentha piperita</i> (М'ята)	гентаміцин	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 19833	9,1	32	1	3,6	0,43	Rosato et al., 2018
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,1	1	3,6	0,03	0,43	
		<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 27853	9,1	2	0,4	0,06	0,08	
	ампіцилін		9,1	16	2,2	4	0,5	
<i>Cinnamomic cassia</i> (Кориця китайська)	стрептоміцин	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4,8	3,1	2,4	1,5	0,5	El Atki et al., 2019
		<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 27853	19,5	3,13	9,7	1,5	0,5	
<i>Pelargonium graveolens</i> (Пелагонія духмяна)	ципрофло- ксацин	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KT2	35,8	16	-	-	0,37	Malik et al., 2011
		<i>Proteus mirabilis</i> PRT3	17,9	16	-	-	0,5	
<i>Coriandrum sativum</i> L (Коріандр)	левоміцетин	<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1041	4	64	-	-	0,47	Duarte et al., 2012
	ципрофло- ксацин	<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1025	1	0,12	-	-	0,28	
	гентаміцин			0,25	-	-	0,25	
	тетрациклін	<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1041	4	1	-	-	0,18	
<i>Trachyspermum ammi</i> (Ажгон)	ципрофло- ксацин	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	160	3	-	-	0,25	Grădinaru et al., 2018

Примітка: «←» дані не наведені

Окрім синергізму, дослідники встановили індеферентний ефект використання суміші ефірної олії з ампіциліном та хлорамфеніколом щодо досліджуваних тест-культур.

Автори роботи (Malik et al., 2011) встановили синергізм (ФІК $\leq 0,5$) використання суміші ефірної олії пеларгонії та ципрофлоксацину щодо ізолятів *K. pneumoniae* KT2 та *Proteus mirabilis* PRT3, які є основною причиною запалення сечовивідних шляхів.

Дослідження (Duarte et al., 2012) показали позитивний ефект використання ефірної олії коріандру з різноманітними антибіотиками щодо штамів *Acinetobacter baumannii* – нозокоміальних збудників, стійких до більшості антибіотиків, які є причиною поширення внутрішньолікарняних інфекцій, в першу чергу пов'язаних з колонізацією медичних матеріалів. При цьому значення ФІК не перевищувало 0,5, що вказує на синергізм дії таких сполук.

Як видно з наведених у табл. 3 даних, перспективним є використання широкого спектру ефірних олій у суміші з комерційними антибіотиками щодо представників родів *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Proteus*.

1.2.2. Антибіотики та інші природні сполуки. Синергізм дії антибіотиків і природних біоцидів має ряд переваг порівняно з використанням відповідних монопрепаратів. Так, деякі рослинні сполуки спричиняють пряму антимікробну дію на стійкі до антибіотиків бактерії, і посилюють дію антибіотиків завдяки різним механізмам: перешкоджають їх проникненню в клітину через порушення функції цитоплазматичної мембрани (Bhattacharya et al., 2018), інгібування ефлюкських насосів (Kakarla et al., 2017) або диспергуванням біоплівки. Окрім цього, такі синергічні взаємодії між природними речовинами та антибіотиками підвищують ефективність використання останніх з одночасним зниженням їх концентрації.

Так, у разі дії суміші природного алкалоїду катарантину, отриманого з рослини *Catharanthus roseous* у суміші з тетрацикліном та стрептоміцином на

P. aeruginosa MTCC-741, вдалося знизити мінімальні інгібуючі концентрації антибіотиків з 1600 до 100 та 200 мкг/л відповідно (Dwivedi et al., 2018) (табл 4).

Ізольований з рослини *Terminalia chebula* біоцид галлотанін є похідним 1,2,6-три-О-галоїл-β-D-глюкопіранози, який у суміші з гентаміцином знижує у 4 рази мінімальну інгібуючу концентрацію антибіотика щодо *E. coli* ATCC 8139 (Bag et al., 2014). Окрім зниження МІК, автори встановили що така суміш інгібує ефлюєсні насоси уропатогена *E. coli* ATCC 8139.

Подібну дію на активність ефлюєсних насосів спостерігали за дії комплексу природних алкалоїдів барбарину та пальматину у суміші з ципрофлоксацином щодо *P. aeruginosa* ATCC27853 (Aghayan et al., 2017).

У роботі (Lavigne et al., 2020) було показано ефективність використання прополісу – природного компонента, отриманого за допомогою бджіл – у комплексі з антибіотиками щодо патогенних штамів *E. coli* – збудників циститу та пієлонефриту (табл. 4.1). Варто зазначити, що комбінація прополісу з офлоксацином, цефтріаксоном та фосфоміцином дозволила знизити МІК антибіотиків з 32-128 до 2-64 мкг/мл, при цьому значення фракційної інгібуючої концентрації не перевищувало показник 0,5, що засвідчує синергізм дії комплексу цих сполук.

Отже, окрім ефірних олій, перспективними до використання у комбінації з антибіотиками, є природні біоциди, зокрема рослинного та тваринного походження, які здатні знижувати ефективні концентрації антибіотиків щодо патогенних збудників інфекційних хвороб.

1.3. Вплив суміші антибіотиків та антимікробних пептидів на грампозитивні та грамнегативні бактерії

Антимікробні пептиди (АМП) розглядаються як нові перспективні антимікробні засоби. АМП значно відрізняються за амінокислотною послідовністю та структурою, але більшість із них є катіонними та можуть приймати амфіпатичну конформацію, таким чином, вони здатні легко

Таблиця 4.1

Дія на грамнегативні бактерії комплексу антибіотиків з іншими природними біоцидами

Біоцид	Походження біоциду	Антибіотик (АБ)	Тест-культура	МІК біоциду, мкг/мл	МІК антибіотику, мкг/мл	МІК компонентів у суміші, мкг/мл			література
						біоциду	АБ	ФІК	
катарантин	Алкалоїд виділений з рослини <i>Catharanthus roseous</i>	тетрациклін	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC-741	400 мг/л	1600 мг/л	25 мг/л	100 мг/л	0,062	Dwivedi et al., 2018
		стрептоміцин	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC-741	400 мг/л	1600 мг/л	25 мг/л	200 мг/л	0,125	
галлотанін	1,2,6-три-О-галоїл-β-D-глюкопіраноза, виділена з <i>Terminalia chebula</i>	гентаміцин	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8139	12,1	1	-	0,25	-	Bag et al., 2014
барбарин	Алкалоїди, виділені з коренів <i>Berberis vulgaris</i>	ципрофлоксацин	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	2000	512	125	128	-	Aghayan et al., 2017
пальматин				2000	512	250	64	-	
прополіс	біоцид зібраний бджолами	цефтріаксон	<i>Escherichia coli</i> NECS 118564	256	>32	-	2	0,04	Lavigne et al., 2020
			<i>Escherichia coli</i> NECS 892420	256	>32	-	2	0,04	
		офлоксацин	<i>Escherichia coli</i> NECS 118564	256	>32	-	8	0,1	
			<i>Escherichia coli</i> NECS 892420	256	>32	-	8	0,16	
		фосфоміцин	<i>Escherichia coli</i> NECS 858785	256	128	-	64	0,25	

Примітка: «-» дані не наведені

взаємодіяти з негативно зарядженими компонентами на поверхні бактеріальних клітин та інтегруватися в біліпідний шар (Yasir et al., 2021).

Основний механізм антибактеріальної дії АМП пов'язаний з їх здатністю змінювати проникність мембрани та пошкоджувати її структуру. Цей процес супроводжується витоком життєво важливих компонентів, іонів і метаболітів. Дестабілізація мембрани додатково впливає на функціонування мембранно-асоційованих білкових комплексів. Деякі АМП є немембранолітичними і проникають через мембрани бактерій, не порушуючи їх цілісності. Вони мають внутрішньоклітинні мішені та перешкоджають метаболічним процесам, включаючи синтез життєво важливих клітинних компонентів. Вважається, що широкомасштабна багатоцільова дія є однією з причин ефективності АМП щодо мультирезистентних штамів бактерій і перешкодою для розвитку високого рівня резистентності до таких сполук (Kampshoff et al., 2019).

Однак природні АМП легко розкладаються протеолітичними ферментами, тому досліджуються різноманітні підходи до підвищення стабільності АМП, такі як виробництво «обмежених» пептидів, циклотидів, гібридних АМП, кон'югатів та іммобілізованих АМП (Kampshoff et al., 2019). Серед вищезазначених методів, кон'югація АМП з традиційними антибіотиками є багатообіцяючою завдяки потенційній синергічній комбінації, що забезпечує ефективне націлювання та знищення стійких патогенних бактерій.

Так, у роботі (Jahangiri et al., 2021) показано можливість використання суміші природного пептиду нізину, а також синтетичного P10 (аналога людського пептиду LL-37) з антибіотиками для дії на грамнегативні бактерії. Встановлено, що обидва пептиди у комплексі з антибіотиками знижували МІК останніх (табл 5.1). Окрім цього, автори зазначають, що синтетичний P10 пептид на відміну від природного є стійкішим та проявляє антимікробну активність щодо стійких до антибіотиків (зокрема, до колістину) штамів *P. aeruginosa* (Jahangiri et al., 2021).

Висока антимікробна активність притаманна й іншому синтетичному пептиду SLAP-S25, який за своєю структурою є ундекапептидом. Так, у разі використання суміші пептиду з комерційними антибіотиками, значення фракційної інгібуючої концентрації не перевищувало 0,5 що вказує на їх синергізм (табл 6). Поєднання пептиду (8 мг/кг) з колістином (1 г/кг) у дослідженнях *in vivo* на моделі перетоніту-сепсису супроводжувалося підвищенням виживання мишей до 90%, у той час у разі використання монпрепарату колістину виживання не перевищувало 20% (Song et al., 2020).

У роботі (Liu et al., 2020) автори встановили синергізм антимікробної активності щодо *P. aeruginosa* ATCC 9027 комплексу антибіотиків (азитроміцину та рифаксимішу) з природними пептидами, одержаних з краба *Scylla paramamosain* (сфістином – 38-амінокислотним пептидом, і Sph₁₂₋₃₈ – коротким фрагментом сфістину) (табл. 5.1).

Зазначимо, що у роботах (Jahangiri et al., 2021; Song et al., 2020; Liu et al., 2020) автори не намагалися встановити механізм антимікробної дії суміші біоцидів, а лише констатували факт наявності синергізму.

Однак, є поодинокі праці у яких окрім встановлення синергізму досліджують механізми що лежать в основі високої антимікробної дії сумішей пептидів та антибіотиків. Так, у роботі (Rishi et al., 2018) за допомогою діелектричної спектроскопії, конфокальної мікроскопії та проточної цитометрії підтвердили взаємодію та локалізацію синтетичних пептидів T3 та T4 з бактеріальною мембраною *S. aureus* ATCC 9144. Було виявлено, що пептиди пригнічують відтік броміду етидію, який є субстратом для багатьох білків, залучених до системи відтоку. Це дало змогу припускати, що пептиди після взаємодії з мембраною збудника могли призвести до інгібування виведення антибіотиків, тим самим зменшуючи їх ефективні концентрації.

Таблиця 5.1

Синергічна антибактеріальна дія суміші пептидів з антибіотиками

Пептид	Походження пептиду	Антибіотик (АБ)	Тест-культура	МІК пептиду, мкг/мл	МІК антибіотику, мкг/мл	МІК компонентів у суміші, мкг/мл			Література
						пептиду	АБ	ФІК	
Нізин	<i>Lactococcus lactis</i>	тобраміцин	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	128	64	16	16	0,5	Jahangiri et al., 2021
			<i>Acinetobacter baumannii</i> XDR 5	64	2	16	0,5	0,5	
		ципрофлоксацин	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> col 2	128	4	32	1	0,5	
P10	хімічно синтезований	цефтазидим	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	4	4	1	1	0,5	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> col 2	8	32	2	4	0,5	
SLAP-S25	хімічно синтезований	рифампіцин	<i>Escherichia coli</i> B2	4	128	-	-	0,031	Song et al., 2020
		тетрациклін		4	128	-	-	0,281	
		ванкоміцин		4	128	-	-	0,094	
Sphistin (Сфістин)	одержані з краба <i>Scylla paramamosain</i>	азитроміцин	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	24	180	-	-	0,35	Liu et al., 2020
рифаксимін		2,5			-	-	0,312		
Sph ₁₂₋₃₈		азитроміцин		12	180	-	-	0,225	
		рифаксимін			2,5	-	-	0,375	
T3	хімічно синтезований	оксациклін	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	307	1	38	0,125	0,25	Rishi et al., 2018
T4		ампіцилін				38	0,125	0,25	
		оксациклін		331		83	0,125	0,38	
ампіцилін		83				0,125	0,38		
melimine (мелімін)	хімічно синтезований	ципрофлоксацин	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6294	250	1	-	-	0,5	Rossi et al., 2016
Mel4		ципрофлоксацин	250	1	-	-	0,5		

Примітка: «←» дані не наведені

Отже, антимікробні пептиди, як природного так і синтетичного походження, є перспективними сполуками для використання у суміші з антибіотиками.

1.4. Антимікробна дія на мікроорганізми комплексу антибіотиків та поверхнево-активних речовин

З моменту публікації огляду (Pirog et al., 2019) у доступній літературі нам вдалося знайти лише декілька праць (Rossi et al., 2016; Joshi-Navare et al., 2013; Rivardo et al., 2011) що стосуються можливості використання мікробних поверхнево-активних речовин у комбінації з антибіотиками, при цьому лише в одній роботі визначали значення мінімальної інгібуючої концентрації, а інші стосувалися дії комплексу ПАР-антибіотик на біоплівки.

Так, у роботі (Rossi et al., 2016) встановлено синергізм антимікробної дії на грамнегативні та грампозитивні бактерії суміші тетрацикліну з поверхнево-активними речовинами, синтезованими штамми *Staphylococcus haemolyticus* (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Дія на грампозитивні і грамнегативні бактерії комплексу ПАР *Staphylococcus haemolyticus* з тетрацикліном (АБ) (Rossi et al., 2016)

продуцент ПАР	Тест-культура	МІК АБ, МКГ/МЛ	МІК ПАР, МКГ/МЛ	МІК АБ у суміші, МКГ/МЛ
<i>S. haemolyticus</i> MD29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 23853	0,76	12.5	0,006
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,7	>25	0,7
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 3598412	0,04	25	0,04
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	31	>25	6,1
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,7	25	0,7
	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	0,7	25	0,04
<i>S. haemolyticus</i> MD49	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,7	>25	0,76
	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	0,7	>25	0,04
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 3598412	0,04	>25	0,04
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 23853	0,7	6,25	0,76
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,7	>25	0,76

У разі використання комплексу ПАР з антибіотиком, спостерігали зниження МІК останнього щодо більшості досліджуваних тест-культур (за виключенням *S.aureus* ATCC 29213 та *E. coli* ATCC 25922, для яких показник МІК у суміші з ПАР не змінювався). Дослідники (Joshi-Navare et al., 2013) встановили, що за дії суміші синтезованих *Candida bombicola* ATCC 22214 софороліпідів (300 мкг/мл) та тетрацикліну (15 мкг/мл), спостерігали повне інгібування росту *S. aureus* ATCC 29737 протягом 4 год, у той час як аналогічний результат досягався за використання монопрепаратів ПАР та антибіотику у вищих концентраціях (400 та 300 мкг/мл відповідно).

У роботі (Rivardo et al., 2011) показано можливість використання суміші ліпопептиду, синтезованого *Bacillus licheniformis* V9T14 у концентрації 5 мкг/мл, та ампіциліну (2 мкг/мл) для руйнування біоплівки *E. coli* CFT073, при цьому ступінь руйнування біоплівки внаслідок дії такої суміші становила 76%. Слід зазначити, що моносполуки як ліпопептиду, так і антибіотику у зазначених вище концентраціях не пригнічували ріст біоплівки.

Аналіз літературних даних щодо синергізму антимікробної активності суміші антибіотиків з різними біоцидами (див табл. 1.1-6.1) дає змогу зробити висновки, що:

1) більшість наявних у літературі праць щодо синергічної дії, стосуються досліджень можливості використання антибіотиків саме з ефірними оліями, що обумовлено високою антимікробною активністю монопрепаратів ефірних олій, здатністю основних їх компонентів (терпенів, фенолів, спиртів тощо), спричиняти пошкодження клітинної мембрани з екстравазацією внутрішньоклітинного вмісту і широким спектром дії, в тому числі і на резистентні мікроорганізми;

2) відмінні від ефірних олій природні сполуки, які за хімічною природою є алкалоїдами, фенолами, містять кумарини і терпени, є також перспективними протимікробними засобами, які у комплексі з антибіотиками здатні інгібувати синтез клітинної стінки, модуляцію чутливості до антибіотиків, утворення біоплівки патогенних мікроорганізмів;

3) використання антимікробних пептидів (як природного, так і синтетичного походження) у суміші з антибіотикам дає змогу як підвищити стійкість пептидів до дії протеолітичних ферментів, так і зменшити ефективну концентрацію антибіотиків;

4) у літературі обмежена кількість робіт, що стосуються можливості використання антибіотиків у комплексі з мікробними поверхнево-активними речовини. При чому, у наявних працях дослідники встановлювали лише факт зменшення концентрації антибіотиків у комплексі, без розрахунку показника фракційної інгібуючої концентрації. Припускаємо, що обмежена кількість робіт щодо синергізму антимікробної активності антибіотиків з такими мікробними метаболітами зумовлена залежністю біологічних властивостей останній від умов культивування продуцентів.

Тим не менше, не дивлячись на досить велику кількість праць, перспективних залишається дослідження механізмів, які лежать в основі синергічної дії сполук у складі комплексу, що дасть змогу збільшити спектр їх застосувань.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Об'єкти досліджень

Штами *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 зареєстровані у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Для визначення біологічних властивостей використовували штами дріжджів *Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida utilis* БМС-65 та *Candida albicans* Д-6 і бактерій *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp МІ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Proteus vulgaris* БТ-1 з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

У роботі використовували:

-**антибіотики:** ципрофлоксацин та офлоксацин – препарати з групи фторхінолонів II покоління;

- **антифунгальні препарати:** флуконазол та клотримазол – синтетичні протигрибкові препарати, що належать до класу азолів широкого спектру дії;

- **ефірні олії:** кориці (виробника ТОВ «РосКосметика», Україна) і чайного дерева, лемонграсу (виробника ТОВ «Ароматика», Україна).

2.2. Культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241

Культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 проводили в рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35; NaCl – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14, дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка), розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка) (**базове середовище**).

Склад розчину мікроелементів (г/100 мл): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; KI – 0,0001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,6; H_3BO_3 – 0,006; ЕДТА (Трилон Б) – 0,5

Як джерело вуглецю використовували наступні субстрати у концентраціях:

- **очищений гліцерин** (3 %, об'ємна частка);
- **відходи виробництва біодизелю** (5%, об'ємна частка (Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.));
- **відпрацьовану соняшникову олію після смаження картоплі «фрі»** 2%, об'ємна частка, (мережа ресторанів швидкого харчування Mcdonald's, Київ)).

В одному з варіантів з базового середовища видаляли хлорид натрію (**середовище 1**); підвищували до 2,0 г/л концентрацію NaCl (**середовище 2**); додатково вносили KCl (1,0 г/л) (**середовище 3**).

Посівний матеріал вирощували на базовому середовищі, що як джерело вуглецю містило 0,5 % (об'ємна частка) відповідного субстрату. Інокулят, який містить бактерії у кількості $10^4 - 10^5$ кл/мл, вносили у кількості 10 % від об'єму середовища. Культивування проводили у 750 мл колбах на качалках зі швидкістю 320 об/хв, при температурі 30 °C, протягом 5 діб.

Для дослідження впливу еукаріотичних індукторів дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1 вирощували упродовж 24 год на качалці (320 об/хв) в базовому для *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 середовищі, як джерело вуглецю використовували глюкозу у концентрації (0,5 %, об'ємна частка). Після однієї доби вирощування культуральну рідину переливали у стерильні епіндорфи та центрифугували (зі швидкістю 10000 g протягом 10 хвилин) для отримання **супернатанту**. Його вносили у кількості 2,5 мл на кожні 100 мл середовища культивування продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР).

Отриману біомасу еукаріотичного індуктора (**живі клітини індуктора**) ресуспендували у стерильній воді до об'єму, взятого для центрифугування і вносили з розрахунку 2,5 мл суспензії на 100 мл середовища культивування продуцента ПАР.

Частину ресуспендованої біомаси піддавали стерилізації в автоклаві при температурі 131 °C протягом 1 години для отримання інактивованих

клітин індуктора. Інактивовані клітини вносили у кількості 10 мл суспензії на кожні 100 мл поживного середовища для культивування продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР).

На початковому етапі культивування вносили індуктор. Штам, який продукує поверхнево-активні речовини (ПАР), культивували в 750-мл колбах з об'ємом середовища 100 мл, на качалках при перемішуванні (320 об/хв) та температурі 30 °С протягом 7 діб.

Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017 культивували у рідкому поживному середовища наступного складу (г/л): NaNO₃ – 1,3; NaCl – 1,0; Na₂HPO₄ – 0,6; MgSO₄ · 7H₂O – 0,1; KH₂PO₄ – 0,14; FeSO₄ · 7H₂O – 0,001.

Як джерело вуглецю використовували наступні субстрати у концентраціях:

- **етанол** (2%, об'ємна частка)
- **очищений гліцерин** (3 %, об'ємна частка);
- **відходи виробництва біодизелю** (5-6%, об'ємна частка (Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.)). Концентрації гліцерину різної якості еквімолярні за вуглецем.

- **відпрацьована соняшникова олія після смаження картоплі «фрі»** (2%, об'ємна частка, (мережа ресторанів швидкого харчування Mcdonald's, Київ)).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену у середовищі, вищенаведеного складу що містило 0,5% відповідного субстрату. Кількість інокуляту з концентрацією 10⁴ – 10⁵ кл/мл складала 5% від об'єму середовища.

Культивування проводили у 750-мл колбах з об'ємом середовища 100 мл на качалці при перемішуванні (320 об/хв) та температурі 30 °С протягом 7 діб.

Для дослідження впливу еукаріотичних індукторів дріжджі *S. cerevisiae* БТМ-1 вирощували упродовж 24 год на качалці (320 об/хв) в

базовому для *R. erythropolis* IMB Ac-5017 середовищі, як джерело вуглецю використовували глюкозу у концентрації (0,5 %, об'ємна частка).

Підготовку індуктора у вигляді **живих клітин, супернатанту та інактивованих клітин** здійснювали як описано вище.

2.3.Визначення концентрації поверхнево-активних речовин

Кількість поверхнево-активних речовин визначали за допомогою модифікованого нами методу Блай і Дайера (Тарасенко, 2008): до традиційної системи розчинників (суміш Фолча), додали 1М HCl (хлороформ - метанол - вода = 4:3:2). Ця модифікована система дозволяє вилучати як полярні, так і неполярні ліпіди з високою ефективністю.

У ділільну лійку об'ємом 100 мл додавали 25 мл супернатанту (одержаного центрифугуванням культурної рідини при 5000 g протягом 20 хв). Для досягнення рН в межах 4,0-4,5 додають 1М розчин HCl (приблизно 5 мл), закривають лійку шліфованою пробкою і перемішують протягом 3 хв. Потім додають 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і змішують (для екстракції ліпідів) протягом 5 хв. Після екстракції залишають отриману суміш в ділільній лійці для поділу фаз. Після цього нижню фракцію (органічний екстракт 1) зливають, а водну фазу піддають повторній екстракції. При повторній екстракції додають 1М розчин HCl до водної фази для забезпечення рН 4,0-4,5 та 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і екстракують протягом 5 хв. Після фазового розділу зливають нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі додають 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) до водної фази і проводять екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 змішують і випарюють на роторному випарнику IP-1M2 при 50 °C і абсолютному тиску 0,4 атм до сталої маси.

У проведених експериментах використовували препарати розчинів поверхнево-активних речовин різних концентрацій. Для цього сухий залишок поверхнево-активних речовин розчиняли у стерильному фосфатному буфері

(0,1 М, рН 7,0) до початкового об'єму (25 мл). Отримані розчини поверхнево-активних речовин стерилізували в автоклаві при 112 °С протягом 30 хвилин.

2.4. Дослідження біологічної активності поверхнево-активних речовин

2.4.1. Встановлення мінімальної інгібуючої концентрації поверхнево-активних речовин

Антимікробну активність поверхнево-активних речовин оцінювали за значенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК проводили шляхом дворазових послідовних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій та рідкому суслі для дріжджів. В умовах стерильності в 10 пробірок вносили по 1 мл поживного середовища, додаючи в першу 1 мл поверхнево-активних речовин (ПАР) певної концентрації, перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку. Так розведення проводили для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл, забезпечуючи тим самим кінцевий об'єм в кожній пробірці на рівні 1 мл, при цьому концентрація ПАР у кожній наступній пробірці зменшувалася вдвічі. Контрольним розчином був 1 мл МПБ чи рідкого сусли без додавання розчину поверхнево-активних речовин. Далі в кожен пробірку додавали по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^5 – 10^6 КУО/мл), перемішували та інкубували протягом 24 годин при температурі 28–30 °С для бактерій та 24–26 °С для дріжджів.

Отримані результати оцінювали візуально, спостерігаючи за мутністю середовища: (+) – позначення для пробірок, в яких була мутність середовища (показник росту тест-культури), (–) – відсутність мутності (відсутність росту). Мінімальну інгібуючу концентрацію поверхнево-активних речовин визначали як значення концентрації досліджуваних речовин у першій пробірці, де спостерігалася відсутність росту.

2.4.2 Дослідження антиадгезивної дії поверхнево-активних речовин

Для визначення антиадгезивних властивостей (Rufino, et al., 2011) попередньо очищені пластинки абіотичних матеріалів (кахель, сталь) однакового розміру (1 см²) піддавали стерилізації при 131° С впродовж 60 хв.

Тест-культури бактерій і дріжджів, вирощених на м'ясо-пептонному агарі (МПА) та сусло-агарі (СА) відповідно суспендували у 100 мл стерильної водопровідної води. В суспензію вносили попередньо оброблені і не оброблені (контроль) препаратами ПАР різної концентрації матеріали, витримували у термостаті упродовж 2 годин за температури 30°C після чого ополіскували 10 мл стерильної водопровідної води для видалення неадгезованих клітин.

Після цього для фіксації адгезованих клітин пластинки матеріалів обробляли 99%-м метанолом протягом 15 хв і висушували при кімнатній температурі. Після чого пластинки поміщали в 1-й % розчин генціанвіолета, витримували 5 хв і ополіскували водопровідною водою. Абіотичні матеріали після просушування обробляли 33-м% розчином оцтової кислоти і вимірювали оптичну щільність отриманої суспензії десорбованих клітин на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм. Кількість (%) адгезованих клітин (адгезія) визначали як відношення оптичної щільності суспензії, отриманої після оброблення поверхонь розчинами ПАР, до оптичної густини суспензії, отриманої після оброблення поверхні фосфатним буфером (контроль), і виражали у відсотках.

2.4.3 Визначення ступеня руйнування біоплівок

Формування біоплівки здійснювали як описано у праці (Marmann, et al., 2014) для цього у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл поживного середовища (м'ясо-пептонного бульйону чи рідкого сусла) та 20 мкл суспензії одnodобової бактеріальної чи дріжджової тест-культури, інкубували у термостаті за оптимальної для росту тест-культур температури упродовж 24 год, після чого культуральну рідину зливали і додавали 180 мкл свіжого МПБ чи сусла і 20 мкл суспензії тест-культури і ще інкубували впродовж наступних 24 год. Через 48 годин живильне середовище зливали і в лунки мікропланшетів, у яких попередньо утворилися біоплівки дослідних культур, додавали по 200 мкл розчинів ПАР різної концентрації. У контрольний варіант (лунку) замість розчину ПАР додати стерильну

водопровідну воду (200 мкл). Через 24 години експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води та спектрофотометрично визначали кількість прилиплих клітин. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначається як різниця в клітинній адгезії в необроблених і оброблених поверхнево-активною речовиною полістирольних лунках планшета

2.5. Визначення синергізму антимікробної та антиадгезивної активності комплексу біоцидів

2.5.1. Синергічна антимікробна дія на мікроорганізми поверхнево-активних речовин, антибіотиків, антифунгальних препаратів та їх суміші

Антимікробну дію антибіотиків (офлоксацину, ципрофлоксацину), антифунгальних препаратів (клотримазолу, флуконазолу) та їх суміші з ПАР аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації як описано у підпункті 2.4.1. Для дослідження синергічної дії розчини антибактеріальних речовин однакової концентрації змішували у співвідношенні 1:1, після чого визначали мінімальну інгібуючу концентрацію суміші методом послідовних двократних серійних розведень.

2.5.2. Синергізм антимікробної дії суміші поверхнево-активних речовин та ефірних олій

Антимікробну активність ефірних олій, поверхнево-активних речовин та їх комбінацій аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК проводили методом двократних серійних розведень, використовуючи рідке сусло для дріжджів і м'ясо-пептонний бульйон для бактерій, як описано у пункті 2.4.1. Для вивчення синергічної дії розчинів ефірної олії та поверхнево-активних речовин однакової концентрації їх змішували у співвідношенні 1:1. Після цього визначали мінімальну інгібуючу концентрацію отриманої суміші за допомогою послідовних двократних серійних розведень.

2.5.2.1. Визначення фракційної інгібуючої концентрації

Для оцінки синергічної дії ПАР з антибіотиками, антифунгальними препаратами та ефірними оліями використовували показник фракційної інгібуючої концентрації (ФІК) – сума відношення концентрації кожної речовини в суміші до їх мінімальної інгібуючої концентрації. Показник ФІК розраховували за формулою

$$FIC=(C_A/MIC_A)+(C_B/MIC_B),$$

де $C_{A,B}$ – концентрація антимікробної речовини в суміші;

$MIC_{A,B}$ – мінімальна інгібуюча концентрація антимікробної речовини окремо.

У суміші співвідношення препаратів складало 1:1, при цьому концентрація поверхнево-активних речовин (ПАР) залишалася сталою, а концентрацію антибіотика/антифунгальної речовини/ефірної олії зменшували методом послідовних двократних розведень. У іншому варіанті концентрація антибіотика/антифунгальної речовини/ефірної олії залишалася незмінною, тоді як концентрацію ПАР зменшували відповідно до вищеприписаного методу.

2.5.3 Дослідження синергізму руйнування біоплівки

Для аналізу впливу комплексу поверхнево-активних речовин (ПАР) та антимікробних (антибіотики), антифунгальних препаратів, ефірних олій на руйнування біоплівки використовували метод, описаний у пункті 2.4.3. Для вивчення синергічного ефекту руйнування біоплівки у лунки мікропланшета вносили суміш ПАР та антимікробних (антибіотики), антифунгальних препаратів, ефірних олій у співвідношенні 1:1. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених лунках полістиролового планшета з використанням ПАР, антибіотиків, антифунгальних препаратів, ефірних олій чи їх сумішей.

2.6. Визначення синергічної дії суміші біоцидів на одно- та двовидові біоплівки

Досліджували вплив ефірної олії, поверхнево-активних речовин (ПАР) та їх комбінації на руйнування бактеріальних двовидових біоплівки за методикою, описаною в роботах (Шинкарук, Кухтин, Вічко, Швед, & Марінцова, 2018; Кухтин, Перкій, & Крушельницька, 2013), з внесенням модифікацій. Для формування біоплівки на полістиролових мікропланшетах вносили 180 мкл м'ясо-пептонного бульйону та 20 мкл суспензії суміші одностовових тест-культур бактерій. Інкубували протягом 24 годин при оптимальній температурі для тест-культур, після чого виливали культуральну рідину і додаючи 180 мкл свіжого м'ясо-пептонного бульйону та 20 мкл суспензії тест-культур, проводили ще інкубацію протягом наступних 24 годин. Після 48 годин виливали культуральну рідину, лунки промивали (тричі) від неадгезованих клітин стерильною водопровідною водою та висушували їх.

У лунки мікропланшета, де вже була сформована біоплівка тест-культур, додавали по 200 мкл препаратів поверхнево-активних речовин (ПАР), ефірної олії чайного дерева та їх комбінації різної концентрації. У контрольних варіантах (в лунках) замість препаратів додавали стерильну водопровідну воду (200 мікролітрів).

Після 24 годин експозиції лунки тричі промивали стерильною водопровідною водою об'ємом 200 мкл. Мікропланшети висушували, фіксували протягом 10 хвилин метанолом, а потім фарбували розчином кристалічного фіолетового у концентрації 0,1%. Після додаткового промивання стерильною водопровідною водою, їх висушували та промивали 200 мкл 33%-ової оцтової кислоти, після чого додаючи 1,8 мл дистильованої води. Оптичну густину суспензії вимірювали на фотоелектроколориметрі (довжина хвилі 540 нм). Ступінь руйнування біоплівки виражали у відсотках (%) і розраховували як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР, ефірних олій чи їх сумішшю лунках полістиролового планшета.

Дослідження взаємодії ефірних олій, поверхнево-активних речовин та їх комбінацій на руйнування двовидових біоплівки дріжджів та бактерій

Дослідження впливу ефірної олії, поверхнево-активних речовин (ПАР) та їх комбінацій на руйнування бактеріально-дріжджових двовидових біоплівки проводили, використовуючи методологію, що описана в роботах (Ceresa et al., 2021; Galdiero et al., 2021), з внесенням модифікацій. Для формування біоплівки на полістиролових мікропланшетах вносили 180 мкл (90 мкл рідкого суслу та 90 мкл МПБ) поживного середовища та 20 мкл суспензії суміші однодобових тест-культур бактерій та дріжджів, інкубували при оптимальній для тест-культур температурі протягом 24 годин. Після цього зливали культуральну рідину і вносили 90 мкл рідкого суслу та 90 мкл МПБ, 20 мкл суспензії суміші тест-культур, інкубуючи протягом наступних 24 годин. Після 48 годин культуральну рідину виливали, лунки тричі промивали від планктонних (неприкріплених) клітин стерильною водопровідною водою та висушували їх. До лунок мікропланшета, на які заздалегідь була нанесена біоплівка тест-культур, додавали по 200 мкл препаратів поверхнево-активних речовин (ПАР), ефірної олії чайного дерева та їх комбінацій різної концентрації. У контрольних варіантах (в лунках) замість препаратів додавали 200 мкл стерильної водопровідної води.

Після 24 годин експозиції, лунки мікропланшета тричі промивали 200 мкл стерильної водопровідної води. Після висушування лунки фіксували протягом 10 хв метанолом і фарбували 0,1% розчином кристалічного фіолетового. Далі проводили додаткове промивання стерильною водопровідною водою, висушування і змивали з поверхні лунок 200 мкл 33%-ової оцтової кислоти. Потім додавали 1,8 мл води і вимірювали оптичну густину отриманої суспензії на фотоелектрокалориметрі (довжина хвилі 540 нм). Ступінь руйнування біоплівки виражали у відсотках (%) і розраховували як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР, ефірних олій чи їх сумішшю лунках полістиролового планшета.

**РОЗДІЛ 3. СИНЕРГІЗМ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS*
ERYTHROPOLIS ІМВ Ас-5017 І *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*
ІМВ В-7241, СИНТЕЗОВАНИХ В РІЗНИХ УМОВАХ
КУЛЬТИВУВАННЯ, З РІЗНИМИ БІОЦИДАМИ**

Антибіотикорезистентність основних збудників інфекційних захворювань залишається основною проблемою сьогодення (Aslam et al., 2018) Ще у 2016 р. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) оприлюднила перелік пріоритетних напрямків збільшення ефективності використання антибіотиків, серед яких їх використання у комбінації з іншими, зокрема природними, сполуками (Founou et al., 2017). Серед таких речовин природного походження найперспективнішими є ефірні олії (ЕО), які завдяки наявності у їх складі терпенів та ароматичних сполук характеризуються високою антибактеріальною та антифунгальною активністю (Owen et al., 2018). Тим не менше, їх використання у вигляді монопрепаратів обмежується високими значеннями (500-1600 мкг/мл) їх мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) щодо більшості бактеріальних та дріжджових культур (Aghraz et al., 2018). Окрім ЕО, іншими природними сполуками, які можуть бути використані у комбінації з антибіотиками, є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР). Незважаючи на широкий спектр біологічних властивостей (антиадгезивна, антимікробна активність, здатність до руйнування біоплівки) цих продуктів мікробного синтезу, відомості про використання їх у комплексі з різними біоцидами є небагаточисельними (Naba et al., 2014).

Раніше було встановлено можливість синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на гідрофільних (глюкоза, етанол), гідрофобних (рідкі парафіни, гексадекан) субстратах (Пирог Софилканич, Покора, Шевчук & Иутинская 2014; Pirog, Sofilkanych, Shevchuk & Shulyakova, 2013). Пізніше (Пирог, Шевчук, Петренко, Палійчук, & Іутинська, 2018) показано, що ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017

притаманна антимікробна та антиадгезивна активність.

3.1. Антибактеріальна активність комплексу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 з антибіотиками

Відомо, що промислове виробництво мікробних поверхнево-активних речовин обмежено насамперед високою собівартістю цільового продукту. Одним з підходів до зменшення вартості таких технологій є використання як субстратів промислових відходів: технічний гліцерин (побічний продукт виробництва біодизелю) та пересмажена соняшникова олія (відхід харчової промисловості). Варто зазначити, що відомі технології очищення біодизелю (відділення метанолу, реакції нейтралізації, вакуумна дистиляція, іонна абсорбція та інші) (Ardi et al., 2015), є економічно не вигідними, а повторне використання пересмажених олій лімітується наявністю у їх складі токсичних альдегідів акриламідів та акролеїну (Patil et al., 2012). Тому використання таких субстратів для синтезу мікробних метаболітів дасть змогу не лише знизити собівартість кінцевого продукту, а й вирішити ряд екологічних проблем, пов'язаних з нерегламентованими викидами промислових відходів у навколишнє середовище.

Вибір антибіотиків був зумовлений тим, що не дивлячись на ефективність використання фторхінолонів як антимікробних засобів, у дослідженнях останніх років повідомляється про збільшення кількості резистентних, зокрема до ципрофлоксацину та офлоксацину, штамів *Escherichia coli* (Bhatnagar et al., 2019), *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao et al., 2020), Umar et al., 2019), та *Staphylococcus aureus* (Raja Ram et al., 2020).

На першому етапі досліджували можливість прояву синергізму антибактеріальної дії поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на промислових відходах з антибіотиками ципрофлоксацином (табл. 3.1) та офлоксацином (табл. 3.2).

Антимікробна активність ципрофлоксацину, поверхнево-активних речовин синтезованих *R. erythropolis* ІМВ

Ас-5017 та їх суміші

Субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл)				ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
		ципрофлоксацину	ПАР	ПАР у суміші з ципрофлоксацином*	ципрофлоксацину у суміші з ПАР**	
відхід виробництва біодизелю	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	2000	102,5	15,6	25,6	0,25
	<i>Pseudomonas</i> sp МІ-2	500	6,8	15,6	3,2	0,47
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	500	3,2	7,8	0,8	0,26
відпрацьована соняшникова олія	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	2000	25,6	500	1,7	0,31
	<i>Pseudomonas</i> sp МІ-2	500	25,6	125	3,4	0,38
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	500	3,4	125	1,7	0,75

Примітка: табл. 3.1 та 3.2: склад поживного середовища для культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 наведено у розділі 2 «Матеріали та методи». *- концентрація поверхнево-активних речовин залишалася сталою, а концентрацію антибіотика знижували методом послідовних двократних розведень **- концентрація антибіотика залишалася сталою, а концентрацію поверхнево-активних речовин зменшували методом послідовних двократних розведень. Під час визначення МІК похибка не перевищувала 5 %.

Встановлено, що незалежно від природи використовуваного субстрату, ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 проявляли синергізм антимікробної активності з досліджуваними антибіотиками. Так, наприклад, мінімальні інгібуючі концентрації поверхнево-активних речовин, отриманих на відходах виробництва біодизелю щодо штамів ІЕМ-1 та. МІ-2 становили 3,2 та 6,8 мкг/мл, ципрофлоксацину – 500 мкг/мл, а їх суміші – 7,8 та 15,6 мкг/мл відповідно. Використання поверхнево-активних речовин, синтезованих на відпрацьованій олії, у суміші з досліджуваними антибіотиками дозволило знизити МІК останніх щодо *E. coli* ІЕМ-1, *Pseudomonas* sp МІ-2 та *S. aureus* БМС-1 з 500 та 2000 мкг/мл до 1,7-3,4 та 1,7 мкг/мл відповідно (див. табл. 3.1).

Схожі закономірності були встановлені у разі використання суміші поверхнево-активних речовин штаму ІМВ Ас-5071 та офлоксацину. При цьому, значення МІК антибіотика щодо бактеріальних тест-культур вдалося знизити у 8-16 разів (див. табл. 3.2).

Згідно даних, наведених у таблицях 3.1 і 3.2, показник фракційної інгібуючої концентрації не перевищував 0,5 (за виключенням значення ФІК для суміші ПАР, утворених на відпрацьованій олії з ципрофлоксацином щодо штаму *E. coli* ІЕМ-1), що вказує на синергізм антимікробної дії цих речовин.

Обговорення отриманих результатів. У доступній літературі наявна інформація щодо застосування ципрофлоксацину (Talei et al., 2019; Maheshwari et al., 2018) та офлоксацину (Maheshwari et al., 2018; Lahmar et al., 2017) у комбінації з ефірними оліями. Так, у праці (Talei et al., 2019) показана можливість застосування ефірної олії ажгону для зниження мінімальної інгібуючої концентрації ципрофолоксацину: внесення ефірної олії (концентрація 30 мкг/мл) у суміш з антибіотиком (співвідношення компонентів 1:1) дозволило знизити МІК останнього щодо *E. coli* ATCC 8739 з 3,6 до 0,6 мг/мл. При цьому значення ФІК дорівнювало 0,5, що вказує на синергізм антимікробної дії таких сполук.

У роботі (Maheshwari et al., 2018) показано можливість використання метанольного екстракту, отриманого з насіння ажгону, у суміші з ципрофлоксацином у боротьбі з резистентними до цього антибіотику штамми мікроорганізмів. Так, науковцями було показано, що у разі використання такого екстракту (концентрація 15,6-250 мкг/мл) супроводжувалося зменшення мінімальної інгібуючої концентрації ципрофлоксацину щодо резистентних штамів *E. coli* з 4-129 до 0,126-8 мкг/мл.

Суміш ефірної олії хлоранту японського (дані щодо ефективної концентрації відсутні) з офлоксацином, зменшувала МІК антибіотика щодо метицилін-резистентного штаму *S. aureus* 760 та *E. coli* з 260 до 4 мкг/мл та з 60 до 6 мкг/мл відповідно (Lahmar et al., 2017). У праці (Naq et al., 2019) показана можливість використання ефірної олії та метанольного екстракту, отриманого з насіння ятрофи у комбінації з офлоксацином. Так, використання обох антимікробних сполук (екстракту і ефірної олії) дозволило знизити МІК антибіотика щодо *E. coli* (штам не вказано) та метицилін-резистентного штаму *S. aureus* 1 з 50 та 100 мкг/мл до 3,1 та 1,5 мкг/мл відповідно.

Зазначимо, що у роботах (Talei et al., 2019; Maheshwari et al., 2018; Lahmar et al., 2017; Naq et al., 2019) дослідники визначали мінімальні інгібуючі концентрації ефірних олій, і не акцентували увагу на досить високих (від 600 до 1100 мкг/мл) їх значеннях, а також можливих підходах до зменшення їх ефективних концентрацій.

Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на промислових відходах, офлоксацину та їх суміші

Субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)				ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
		офлоксацину	ПАР	ПАР у суміші з офлоксацином*	офлоксацину в суміші з ПАР**	
Відхід виробництва біодизелю	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	2500	102,5	25,5	780	0,24
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	1250	3,2	1,7	390	0,50
	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	1250	6,8	3,6	195	0,52
відпрацьована соняшникова олія	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	2500	25,6	3,4	390	0,16
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	1250	3,4	1,7	195	0,5
	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	1250	25,6	3,4	390	0,16

3.2. Дія на дріжджі роду *Candida* комплексу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 з антифунгальними препаратами

Кожного року збільшується кількість публікацій, присвячених дослідженням збудників внутрішньолікарняних інфекційних захворювань, серед яких особливе місце посідають представники роду *Candida* (Singh et al., 2020). Це, зумовлено швидким поширенням їх резистентних форм, на тлі тривалого і неконтрольованого вживання широкого спектру дії антибіотиків, імуносупресивною терапією, досить тривалою катетеризацією хворих тощо (Singh et al., 2020).

У порівнянні з антибактеріальними, чисельність протигрибкових засобів є набагато меншою. Це обумовлено довготривалою та проблематичною розробкою нових препаратів для селективної боротьби з еукаріотичними патогенами без токсичного впливу на клітини людини (Pappas et al., 2016). В даний час доступними є лише п'ять класів препаратів, для лікування еукаріотичних інфекцій: азоли (флуконазол, міконазол, клотримазол), полієни (амфотерицин, ністатин), ехінокандини (мікафунгін, аспофунгін, анідулафунгін), аліламіни (тербінафін) та аналоги піримідину (флуцитозин) (Tsui et al., 2016).

В умовах обмеженої кількості сполук, більшість клінічних патогенів роду *Candida* (зокрема *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, та *C. glabrata*) є резистентними до азолів (Bhattacharya et al., 2020) – найбільш вживаних для лікування грибкових інфекцій різної етіології (Tsui et al., 2016).

Одним з підходів до збільшення ефективності застосування наявних антифунгальних сполук є використання відразу кількох таких препаратів (наприклад каспофунгіну та мікофунгуну) (Cui et al., 2015); ністатину та наночастинок оксиду цинку (Hosseini et al., 2020), комбінація антифунгальних сполук з рослинними екстрактами чи ефірними оліями (Jafri et al., 2020). При цьому концентрація таких природних компонентів в

суміші має бути мінімальною, що пов'язано зі здатністю ЕО при потраплянні в організм викликати аспіраційну пневмонію та важкі ураження центральної нервової системи. Цей факт зумовив пошук методів зниження концентрації ефірних олій за збереження їх властивостей, зокрема в суміші з іншими природними сполуками, якими можуть бути мікробні ПАР.

Інтерес до таких антимікробних агентів як поверхнево-активні речовини зумовлений унікальним механізмом їх дії, що ґрунтується на порушенні цілісності цитоплазматичної мембрани, завдяки чому практично унеможливує виникнення резистентних мікроорганізмів (Singh et al., 2004).

Зазначимо, біологічна активність мікробних ПАР може змінюватися в різних умовах культивування, що потрібно врахувати при розробці технології одержання таких метаболітів залежно від сфери їх практичного використання. Так, раніше було показано, що *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезує ПАР, що проявляють антифунгальну і антимікробну дію, встановлено можливість регуляції біологічної активності таких ПАР культивуванням штаму ІМВ В-7241 у середовищі з підвищеною концентрацією катіонів кальцію та магнію – активаторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази, ключового ферменту біосинтезу ліпопептидів, які є основними антимікробними агентами (Pirog, Sidor & Lutsai, 2016) та катіонів калію і натрію (Pirog, Lutsay, Shevchuk, & Iutynska, 2021). Ці одновалентні катіони у високих (50 та 100 мМ) концентраціях є інгібіторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази, що в кінцевому результаті зумовлювало низьку антимікробну та антифунгальну активність синтезованих за таких умов культивування ПАР (Pirog, Sidor & Lutsai, 2016).

Попередні дослідження показали, що ПАР, синтезовані *Nocardia vaccini* ІМВ В-7405, проявляли синергізм антимікробної активності щодо широкого спектру бактерій та дріжджів у суміші з антифунгальними сполуками (ністатином та флуконазолом) (Pirog, & Nikitiuk, 2017) та ефірними оліями (Pirog, Kliuchka, Kliuchka, Shevchuk, & Iutynska, 2020).

У зв'язку з цим припустили, що можна посилити антифунгальну активність синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 поверхнево-активних речовин за наявності одновалентних катіонів (Pirog, Lutsay, Shevchuk, & Iutynska, 2021) у суміші з протигрибковими засобами та ефірними оліями. Це дасть змогу одночасно підвищити ефективність використання не тільки поверхнево-активних речовин, а й антифунгальних препаратів чи ефірних олій, а також знизити концентрацію компонентів у суміші.

На першому етапі встановлювали синергізм антифунгальної активності ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у комплексі з клотримазолом (табл. 3.3) і флуконазолом (табл. 3.4). Вибір цих антифунгальних засобів обумовлений наявністю відомостей щодо поширення резистентних дріжджів роду *Candida* на тлі широкого використання азолів (Bhattacharya et al., 2020; Tsui et al., 2016), та можливістю комбінації антифунгальних препаратів з природними сполуками (Tabbene et al., 2015; Kumar et al., 2013; Carbone et al., 2019; Carbone et al., 2015) (в тому числі і мікробного походження (Tabbene et al., 2015)).

Показано, що ПАР, утворені *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на базовому середовищі, є найбільш ефективними антифунгальними агентами: встановлені значення МІК щодо дріжджових тест-культур становили 22,5-45 мкг/мл, і були нижчими ніж мінімальні інгібуючі концентрації поверхнево-активних речовин одержаних на середовищах 1-3. Разом з тим, незалежно від умов культивування штаму ІМВ В-7241 та значень МІК, усі синтезовані поверхнево-активні речовини у суміші з клотримазолом знижували мінімальні інгібуючі концентрації цього антифунгального засобу щодо *S. utilis* БМС-65, *S. tropicalis* РЕ-2 та *S. albicans* Д-6, у 4-32 рази. При цьому показник ФІК, не перевищував 0,5, що вказує на синергізм між сполуками.

Окрім клотримазолу, ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 в різних умовах культивування, також проявляли синергізм антифунгальної активності у суміші з флуконазолом (табл. 3.4).

Значення мінімальних інгібуючих концентрацій флуконазолу щодо *C. utilis* БМС-65, *C. tropicalis* PE-2 та *C. albicans* Д-6, у суміші з поверхнево-активними речовинами *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 вдалося знизити з 35,5 мкг/мл до 1,1-9,3 мкг/мл.

Таблиця 3.3

Дія на дріжджі роду *Candida* клотримазолу, поверхнево-активних речовин синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та їх суміші

Середовище для синтезу ПАР	Тест-культура	Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)			ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
		ПАР	ПАР в суміші з клотримазолом*	клотримазолу в суміші з ПАР**	
середовище 1	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	304	19	3,9	0,12
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	304	38	3,9	0,18
	<i>Candida albicans</i> Д-6	608	38	3,9	0,06
середовище 2	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	118	14,7	15,6	0,36
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	59	14,7	7,8	0,49
	<i>Candida albicans</i> Д-6	118	29,5	15,6	0,49
середовище 3	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	384	48	7,8	0,24
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	384	48	7,8	0,24
	<i>Candida albicans</i> Д-6	769	96,1	3,9	0,18
базове	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	22,5	5,6	3,9	0,3
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	45	11,2	1,9	0,3
	<i>Candida albicans</i> Д-6	22,5	5,6	1,9	0,28

Примітки: 1) табл. 3.3–3.4: склад середовищ 1–3 та базового наведено у розділі 2 «Матеріали і методи»; Як джерело вуглецю використовували відпрацьовану після смаження картоплі фрі соняшникову олію концентрації 2 % (об'ємна частка)

2) * – концентрація антифунгального препарату залишалася сталою, а концентрацію поверхнево-активних речовин зменшували методом послідовних двократних розведень;

** – концентрація поверхнево-активних речовин залишалася сталою, а концентрацію антифунгального препарату знижували методом послідовних двократних розведень;

3) мінімальна інгібуюча концентрація клотримазолу щодо *C. albicans* Д-6 та *C. tropicalis* PE-2 становила 62,5 мкг/мл, щодо *C. utilis* БМС-65 – 31,2 мкг/мл.

Незважаючи на вищі значення фракційної інгібуючої концентрації суміші ПАР, утворених на середовищі 3, з флуконазолом (ФІК 0,51–0,76), мінімальні інгібуючі концентрації останнього вдалося знизити майже у 4 рази (з 35,5 до 9,3 мкг/мл) (див. табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Синергізм антифунгальної дії комплексу поверхнево-активних ечовин,
утворених *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та флуконазолу**

Середовище для синтезу ПАР	Тест-культура	Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)			ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
		ПАР	ПАР в суміші з флуконазолом*	флуконазол в суміші з ПАР**	
середовище 1	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	304	38	2,3	0,18
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	304	38	2,3	0,18
	<i>Candida albicans</i> Д-6	608	76	4,6	0,24
середовище 2	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	118	7,3	9,3	0,32
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	59	7,3	4,6	0,24
	<i>Candida albicans</i> Д-6	118	14,7	9,3	0,38
середовище 3	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	384	192,2	9,3	0,76
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	384	96,1	9,3	0,71
	<i>Candida albicans</i> Д-6	769	192,2	9,3	0,51
базове	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	22,5	5,6	1,1	0,3
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	45	5,6	1,1	0,18
	<i>Candida albicans</i> Д-6	22,5	5,6	4,6	0,36

Примітка: мінімальна інгібуюча концентрація флуконазолу щодо *C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* PE-2 *C. utilis* БМС-65 становила 35,5 мкг/мл.

Обговорення отриманих результатів. У літературі наявні лише поодинокі праці щодо синергізму антифунгальних сполук з поверхнево-активними речовинами мікробного походження (Tabbene et al., 2015), та іншими природними сполуками (Kumar et al., 2013; Carbone et al., 2019; Carbone et al., 2015). Так, поверхнево-активні ліпопетиди *Bacillus subtilis* B38 проявляли щодо *C. albicans* ATCC 10231, та клінічних ізолятів *C. albicans* та *C. tropicalis* (штами не вказані) синергізм антифунгальної активності з амфотерицином В (Tabbene et al., 2015). При цьому МІК монопрепаратів ліпопетидів та амфотерицину В становив 12,5-25 мкг/мл та 0,25-1 мкг/мл відповідно. Використання препаратів у суміші дозволило знизити як концентрацію ліпопетидів (до 0,39 мкг/мл щодо *C. albicans* ATCC 10231 та

до 0,78-1,56 мкг/мл для клінічних ізолятів), так і амфотерицину В (0,06 мкг/мл щодо штаму АТСС 10231 та 0,25 мкг/мл щодо клінічних ізолятів).

Kumar et al., 2013 встановили, що синтезовані *Bacillus* sp. N, циклічні дипептиди (дикетопіперазини) у суміші з клотримазолом проявляли синергізм щодо *C. albicans* МТСС 277. Так, МІК дипептиду Cyclo-(L-Pro-L-Leu) та клотримазолу щодо штаму МТСС 277 становили 64 та 8 мкг/мл, а в суміші знижувалися до 2 та 1 мкг/мл відповідно. При цьому значення ФІК не перевищувало 0,15, що вказує на синергізм. Подібні результати встановили при використанні суміші Cyclo(D-Pro-L-Leu) та Cyclo(L-Pro-L-Tyr) з клотримазолом (Kumar et al., 2013). Їх МІК щодо *C. albicans* МТСС 277 становили 2–4 мкг/мл відповідно, у той час як мінімальні інгібуючі концентрації монопрепаратів дипептидів та клотримазолу перебували в межах 16-32 мкг/мл та 8 мкг/мл відповідно. Варто зазначити, що за концентрації понад 200 мкг/мл, спостерігали цитотоксичний ефект дикетопіперазинів щодо фібробластних та епітеліальних клітинних ліній людини що вказує на безпечність використання такого природного метаболіту.

У попередніх дослідженнях (Pirog et al., 2017) було показано синергізм антифунгальної активності суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 та флуконазолу. Проте «класичного» визначення синергізму з розрахунком значень фракційної інгібуючої концентрації у роботі (Pirog et al., 2017) не здійснювали, а визначали мінімальні інгібуючі концентрації суміші, в якій співвідношення ПАР та флуконазолу варіювало у бік зменшення вмісту останнього. Тому порівняти наведені у попередніх дослідженнях результати і одержані в даній роботі є не можливим.

Також у літературі наявні відомості про синергізм антифунгальної активності ефірних олій (Carbone et al., 2019) та екстрактів (Carbone et al., 2015) рослинної сировини у комбінації з клотримазолом.

У роботі (Carbone et al., 2019) встановлено, що мінімальна інгібуюча концентрація клотримазолу щодо *C. albicans* ATCC 10231 становила 128 мкг/мл, а суміші з ЕО лаванди або розмарину (співвідношення 1:1, концентрація ефірних олій 0,5-2 %, об'ємна частка) знижувалося до 78 та 62,5 мкг/мл відповідно. Варто зазначити, що суміш клотримазолу з ефірними оліями використовували у формі наноструктурованих ліпідних носіїв, що дозволило знизити цитотоксичність ефірних олій.

Carbone та інші показали, що α - та β -асарони – основні компоненти лепехи звичайної, проявляли антифунгальну дію щодо представників роду *Candida* не тільки у вигляді монопрепаратів, а й у комбінації з азолами (клотримазолом, флуконазол). Так, у разі використання суміші α -асаронів з клотримазолом спостерігали зниження щодо *C. tropicalis* МТСС 184 мінімальних інгібуючих концентрацій як антифунгального препарату (з 1 до 0,25 мкг/мл) так і природної сполуки (з 500 до 2 мкг/мл для α - та β -асарони відповідно) (Carbone et al., 2015).

Одержані результати (див. табл. 3.3 і 3.4) показали, що МІК клотримазолу та флуконазолу у суміші з ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованими як на базовому, так і середовищах 1-3, є порівняним, а в деяких випадках і нижчим, ніж описано у літературі (Tabbene et al., 2015; Kumar et al., 2013; Carbone et al., 2019; Carbone et al., 2015).

3.3. Синергічна антимікробна активність суміші ефірних олій з поверхнево-активними речовинами *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

У попередніх дослідженнях було встановлена синергічна антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 з антибіотиками (Пирог, Никитюк, & Шевчук, 2017), протигрибковими засобами (Pirog & Nikituk, 2017) та ЕО чайного дерева, лемонграсу та кориці (Pirog, Kliuchka, Kliuchka, Shevchuk, & Iutynska, 2020). У зв'язку з цим припустили, що ПАР, утворені штамми *A. calcoaceticus* ІМВ

В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 окрім синергізму з антифунгальними засобами та антибіотиками відповідно, також проявлятимуть антимікробний ефект у комбінації з ефірними оліями.

Щодо вибору ефірних олій він був зумовлений тим що, цинамальдегід – основний компонент олії кориці шляхом зв'язування з ферментами перешкоджає синтезу ергостеролу, що беруть участь у формуванні цитоплазматичної мембрани у клітинах дріжджів (da Nóbrega Alves et al., 2017). Гераніол, цитрал, цитронелал та цитронеллол, що є основними компонентами ефірної олії лемонграсу, інгібують утворення гіфів як одного з факторів вірулентності у представників роду *Candida* (Gaspar de Toledo et al., 2020). Ефірна олія чайного дерева містить такі основні компоненти: терпінен-4-ол, α - і γ -терпінен і 1,8-цинеол, які викликають втрату іонів калію та підвищують проникність цитоплазматичної мембрани переважно у бактерій (Chouhan et al., 2017).

Дослідження показали, що синтезовані *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на промислових відходах поверхнево-активні речовини проявляли синергізм антимікробної дії з ефірною олією чайного дерева. Так, наприклад, використання такої суміші ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, і ефірної олії чайного дерева дозволило знизити МІК останньої щодо *E.coli* ІЕМ-1 з 625 мкг/мл до 2,4 мкг/мл. Значення фракційної інгібуючої концентрації не перевищувала 0,5, що вказує на їх синергізм (табл. 3.5). У попередній роботі (Пирог Конон, & Скочко, 2011) було показано можливість застосування суміші ПАР, утворених *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на етанолі і ЕО чайного дерева, проте синергізм визначали за ступенем виживання клітин в суспензійній культурі, що не дає нам змоги наведені у табл. 3.5 порівняти з попередніми результатами.

На наступному етапі, встановили що використання ПАР, отриманих в різних умовах культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у суміші ефірної олії кориці дало змогу знизити МІК останньої щодо досліджуваних дріжджів роду *Candida* у 4-18 разів (з 156 до 8,5–39 мкг/мл, табл. 3.6).

Синергічна дія на бактерії комплексу поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* IMB Ас-5017 та ефірної олії (ЕО) чайного дерева

Субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)				ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
		ПАР	ЕО	ПАР у суміші з ЕО *	ЕО в суміші з ПАР**	
відпрацьована олія	<i>Pseudomonas sp</i> MI-2	440	312	3,4	4,8	0,02
	<i>Staphylococcus aureus</i> BMC-1	25,6	156	6,4	9,75	0,31
	<i>Ecsherihia coli</i> IEM-1	3,4	625	0,85	156	0,49
відходи виробництва біодизелю	<i>Pseudomonas sp</i> MI-2	6,8	312	3,4	4,8	0,01
	<i>Staphylococcus aureus</i> BMC-1	51,2	156	12,8	19,5	0,37
	<i>Ecsherihia coli</i> IEM-1	3,2	625	0,8	2,4	0,25

Примітка: табл. 3.5-3.6: *- концентрація ЕО залишалася сталою, а концентрацію ПАР зменшували методом послідовних двократних розведень, **- концентрація ПАР залишалася сталою, а концентрацію ЕО знижували методом послідовних двократних розведень. Під час визначення МІК похибка не перевищувала 5%.

Синергізм між сполуками встановлювали за показником ФІК, який при цьому не перевищував 0,5. Синергізм антифунгальної активності спостерігали у разі використання ефірної олії лемонграсу у суміші з ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Так, МІК щодо *C. albicans* Д-6 ПАР, синтезованих на усіх середовищах, становили 22,5-769 мкг/мл, ефірної олії лемонграсу – 312 мкг/мл, а їх суміші всього 9,7-39 мкг/мл. Значення ФІК не перевищувало 0,5.

У опублікованому огляді (Pirog et al., 2019) ми повідомляли про синергізм антимікробної дії ефірних олій (в тому числі, й ефірної олій чайного дерева) та антифунгальної дії на дріжджі роду *Candida* суміші ПАР, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 з ефірними оліями кориці та лемонграсу. У разі використання суміші утворених *N. vaccinii* ІМВ В-7405 ПАР та ефірних олій мінімальні інгібуючі концентрації щодо *C. utilis* БМС-65, *C. tropicalis* РЕ-2 та *C. albicans* Д-6, вдалося знизити у 4-32 рази.

Варто зазначити, що моменту публікації огляду (Pirog, Kliuchka, & Kliuchka, 2019) і до теперішнього часу нам не вдалося знайти інформацію про синергічну дію на дріжджі роду *Candida* суміші мікробних ПАР з ефірними оліями.

Разом з тим у 2021 р. Нерман et al., 2021 опублікували огляд де наведена інформація щодо використання у боротьбі резистентними штамми роду *Candida* комбінації рослинних екстрактів, ефірних олій (гібіскуса, м'яти, чайного дерева, лаванди, та ін.) з флуконазолом, кетоконазолом, амфотерицином В. Однак відсутні дані щодо можливості використання мікробних ПАР, які, як і рослинні екстракти чи ефірні олії, є природними компонентами, проявляють унікальний механізм антифунгальної активності та унеможливають появу резистентних штамів мікроорганізмів

Антифунгальна активність щодо дріжджів суміші поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та ефірної олії кориці

Середовище для синтезу ПАР	Тест-культура	Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)			ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
		ПАР	ПАР в суміші з ЕО*	ЕО в суміші з ПАР**	
середовище 1	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	304	9,5	39	0,28
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	304	9,5	19,5	0,13
	<i>Candida albicans</i> Д-6	608	19	19,5	0,04
середовище 2	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	118	14,7	39	0,37
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	59	7,3	39	0,37
	<i>Candida albicans</i> Д-6	118	14,7	39	0,37
середовище 3	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	384	12	19,5	0,13
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	384	12	19,5	0,13
	<i>Candida albicans</i> Д-6	769	24	19,5	0,13
базове	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	22,5	2,8	39	0,34
	<i>Candida utilis</i> БМС-65	45	1,4	19,5	0,11
	<i>Candida albicans</i> Д-6	22,5	1,4	9,7	0,11

Примітка: мінімальна інгібуюча концентрація ефірної олії кориці щодо усіх дріжджових тест-культур становила 156 мкг/мл.

Висновки до розділу 3

Незалежно від умов культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 поверхнево-активні речовини проявляли синергізм антибактеріальної та антифунгальної активності у суміші з антибіотиками, протигрибковими лікарськими засобами та ефірними оліями.

Використання промислових відходів, таких як відхід виробництва біодизелю, відпрацьована соняшникова олії для одержання ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 дасть змогу не лише знизити собівартість кінцевого продукту, а й вирішити ряд екологічних проблем, пов'язаних з нерегламентованими викидами таких токсичних відходів у навколишнє середовище.

Тим не менше, умови культивування впливають на біологічну активність синтезованих ПАР, що необхідно враховувати при розробці технологій цих продуктів мікробного синтезу.

РОЗДІЛ 4. СИНЕРГІЧНА АНТИАДГЕЗИВНА АКТИВНІСТЬ БІОЦИДІВ З ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017, СИНТЕЗОВАНИМИ В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ

Відомо, що використання промислових відходів є одним з шляхів здешевлення технології синтезу вторинних практично цінних метаболітів, що також дає змогу зменшити нерегламентовану кількість їх викидів у навколишнє середовище (Ardi et al., 2015; Patil et al., 2012),.

До прикладу, за рік в Україні утворюється близько 25 тис. тон біодизелю <https://uabio.org/liquid-biofuels/>, з яких 10% це побічний продукт його виробництва (технічний гліцерин), що може містити різноманітні домішки, такі як метанол, солі, залишки жирних кислот, що мінімізує шляхи його подальшої переробки (Chatzifragkou та ін., 2012). Майже 50% від загального обсягу олієвмісних субстратів є відходами (пересмажені олії) харчової промисловості (Сіурко та ін., 2022).

При цьому, наявні у літературі дані стосуються лише досліджень можливості використання різноманітних промислових відходів для синтезу вторинних метаболітів (зокрема і мікробних ПАР), і лише поодинокі згадки щодо дослідження їх біологічних властивостей.

У розділі 3 було показано, що ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017, синтезовані на промислових відходах, є ефективними антимікробними агентами, в тому числі і у суміші з антибіотиками та ефірною олією чайного дерева. Окрім антимікробної активності, мікробні ПАР проявляють і антиадгезивну дію. Тому на наступному етапі досліджували можливість прояву синергізму антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у суміші з антибіотиками та ефірними оліями.

4.1. Вплив комплексу антибіотиків з поверхнево-активними речовинами *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на прикріплення мікроорганізмів до абіотичних поверхонь

Більшість наявних у літературі праць стосуються дослідження фізіології клітин всередині біоплівки, при цьому майже відсутні їх дослідження під час першої стадії формування біоплівки, тобто адгезії. Варто зазначити, що на сьогодні вплив матеріалу на фізіологію бактерій на стадії адгезії не досліджений. Разом з тим, у декількох працях є відомості, що тип інертної поверхні впливає на їхню стійкість до антибіотиків (Guilbaud та ін., 2017) та вірулентність (Siryarom та ін., 2014).

Варто зазначити, що дослідження бактеріальної адгезії досі зосереджувалися лише на підрахунку кількості прикріплених клітин до різних абіотичних поверхонь (Gadenne та ін., 2013), які характеризувалися певною поверхневою енергією, зарядом, рельєфом і жорсткістю матеріалів (Song et al., 2015).

Однак ступінь впливу фізико-хімічних властивостей матеріалу на фізіологію адгезії бактерій, ще потребує з'ясування. Це ключове питання, особливо щодо безпеки таких матеріалів, оскільки встановлення впливу фізико-хімічних властивостей на адгезію дозволять шляхом виробу матеріалу, модифікація твердої поверхні тощо, зменшити пов'язані з адгезією ризики, зокрема подальше формування біоплівки і збільшення її стійкості до антимікробних речовин.

У таблиці 4.1 наведені дані щодо прикріплення тест-культури до кахелю, обробленого препаратами поверхнево-активних речовин синтезованими *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на промислових відходах, антибіотиками та їх сумішшю. Встановлено, що не залежно від типу субстрату для синтезу поверхнево-активних речовин, останні проявляли синергізм антиадгезивної дії у суміші з антибіотиками: адгезія досліджуваних тест-культур була 1,5-2 у рази нижчою, у порівнянні з такою, встановленою для монопрепаратів ПАР та антибіотиків (табл. 4.1). Так, наприклад, адгезія *P. vulgaris* БТ-1 за дії ПАР у діапазоні концентрацій 7,5-60 мг/мл становила 26-47%, ципрофлоксацину 29-49%, офлоксацину – 35-55 %, а суміші ПАР з антибіотиками – лише 21-39 та 17-40% відповідно.

Таблиця 4.1

Прикріплення грамнегативних мікроорганізмів до кахелю обробленого препаратами ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиками та їх сумішшю

Субстрат	Тест-культура	Концентрація препаратів, мкг/мл	Адгезія (%) тест-культур за дії препаратів				
			ПАР	офлоксацину	ципрофлоксацину	суміші ПАР та офлоксацину	суміші ПАР та ципрофлоксацину
очищений гліцерин	<i>Proteus vulgaris</i> БТ-1	62,5	32	35	29	27	25
		31,2	40	47	35	30	22
		15,6	47	53	47	35	31
		7,8	51	55	49	40	39
відходи виробництва біодизелю		62,5	26	35	29	17	21
		31,2	31	47	35	23	25
		15,6	41	53	47	29	31
		7,8	47	55	52	34	35
очищений гліцерин	<i>Pseudomonas</i> sp. MI-2	62,5	32	33	24	25	27
		31,2	38	45	33	23	31
		15,6	44	48	45	33	36
		7,8	51	55	54	40	44
відходи виробництва біодизелю		62,5	28	33	24	19	23
		31,2	33	45	33	21	29
		15,6	45	48	45	36	31
		7,8	50	55	54	41	37
очищений гліцерин	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	62,5	22	35	31	27	21
		31,2	27	44	48	30	27
		15,6	37	54	54	39	34
		7,8	42	68	63	44	42
відходи виробництва біодизелю		62,5	23	35	31	25	20
		31,2	20	44	48	31	27
		15,6	31	54	54	58	33
		7,8	45	68	63	40	49

Примітки: табл. 4.1-4.3: склад поживного середовища та концентрація субстратів для синтезу ПАР, наведено у розділі 2 «Матеріали та методи»; під час визначення адгезії похибка не перевищувала 5 %.

Аналогічні закономірності щодо зниження адгезії *Pseudomonas* sp. МІ-2 та *E. cloacae* С-8 спостерігали у разі використання для обробки кахелю суміші ПАР та антибіотиків, у порівнянні з використанням монопрепаратів поверхнево-активних речовин чи антибіотиків (див табл. 4.1).

Окрім цього, варто зазначити, що ступінь адгезії тест-культур, за використання у суміші з антибіотиками ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, був вищим, ніж у разі використання суміші антибіотиків і поверхнево-активних речовин, одержаних на очищеному субстраті.

На наступному етапі досліджували вплив на адгезію тест-культур до сталі, обробленої монопрепаратами та сумішшю поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та антибіотиків (табл. 4.2). Так, у разі використання суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих як на очищеному субстраті, так і відходах виробництва біодизелю та антибіотиків спостерігали зниження на 59-83% ступеня адгезії тест-культур до сталі, у порівнянні з монопрепаратами ПАР (зниження адгезії на 50-78%), ципрофлоксацину (на 42-72%) та офлоксацину (на 43-75%).

Так, наприклад, адгезія *Pseudomonas* sp. МІ-2 у разі використання монопрепаратів ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині та відходах виробництва біодизелю, у концентрації 15 мкг/мл становила 35-43%, ципрофлоксацину – 44%, офлоксацину – 40%, а їх суміші 31-35 та 26-33% відповідно.

Обговорення отриманих результатів. Щороку збільшується кількість повідомлень про те, що швидкість поширення внутрішньолікарняних інфекцій наряду залежить від забруднення поверхонь з якими контактує медичний персонал та хворі. Так, згідно даних до 100% та 90% випадків захворювань спричинених *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *S. aureus* та *Candida albicans* відповідно виникають через контакт з абіотичними медичними поверхнями (Jabłońska-Trypuć et al., 2022). Так, наприклад, навіть при обробці дезенфікуючими засобами, клітини *E. coli* здатні до 8 тижнів

виживати на поверхні кахелю, до 60 діб на нержавіючій сталі (Esteves et al., 2016), *Enterobacter cloacae* на нержавіючій сталі до 24 діб (Weterings et al., 2019), метицилінрезистентні штами золотистого стафілококу до 4 та 8 тижнів на матеріали підлоги (кахелі) та нержавіючій сталі відповідно (Esteves et al., 2016).

Враховуючи ці дані, як абіотичні поверхні для дослідження синергізму антиадгезивної дії був обраний кахель та сталь, представники роду *Pseudomonas* та *Enterobacter* як тест-культури.

Зазначимо, що у літературі наявні дані (Asadi et al., 2019; Dong et al., 2019) що концентрації антибіотиків, менші за кількість, необхідну для знищення бактерій (інгібуюча концентрація), впливають на біохімію спайок і властивості поверхні бактерій, а субмінімальна інгібуюча концентрація (суб-МІК) антибіотиків може зменшити адгезію до багатьох поверхонь (Asadi et al., 2019). Так, наприклад концентрація ципрофлоксацину нижче (1/4 МІК) його мінімальної інгібуючої концентрації (32 мкг/мл) викликає зниження гідрофобної природи бактеріальної поверхні для штаму *E. coli* DC3233 (Dong et al., 2019). Фібронектин-зв'язуючі білки А і В, кодовані *fnbA/B*, є основними детермінантами патогенезу у *S. aureus* через їх участь у адгезії до клітин господаря. При цьому, використання рифампіцину у концентрації 1/2МІК зменшує зв'язування фібронектину у *S. aureus* і відповідно зменшує прикріплення бактерій до поверхні (Rasigade et al. 2011).

У доступній літературі відсутні відомості щодо антиадгезивної активності суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю з антибіотиками.

Разом з тим, наявні дані щодо використання комплексу антибактеріальних сполук з ципрофлоксацином. Останні, завдяки механізму дії що полягає у пригніченні активності ферменту топоізомерази II типу є ефективним антиадгезивним агентом.

Таблиця 4.2

Вплив препаратів на прикріплення мікроорганізмів до сталі обробленої препаратами ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиками та їх сумішшю

Субстрат	Тест-культура	Концентрація препаратів, мкг/мл	Адгезія (%) за дії препаратів				
			ПАР	офлоксацин	ципрофлоксацин	суміші ПАР та офлоксацину	суміші ПАР та ципрофлоксацину
очищений гліцерин	<i>Proteus vulgaris</i> БТ-1	62,5	25	25	28	17	25
		31,2	30	35	32	25	29
		15,6	34	31	46	30	34
		7,8	38	43	56	34	38
відходи виробництва біодизелю		62,5	22	22	28	21	19
		31,2	24	31	32	23	25
		15,6	31	38	46	26	24
		7,8	38	43	56	31	31
очищений гліцерин	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	62,5	29	28	28	25	17
		31,2	40	36	36	33	28
		15,6	43	40	44	33	31
		7,8	50	51	58	40	38
відходи виробництва біодизелю		62,5	25	28	28	19	23
		31,2	26	36	36	21	29
		15,6	35	40	44	26	35
		7,8	38	51	58	35	35
очищений гліцерин	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	62,5	26	25	30	27	23
		31,2	32	34	30	30	28
		15,6	40	44	38	29	33
		7,8	42	48	41	35	40
відходи виробництва біодизелю		62,5	23	25	30	25	20
		31,2	31	34	38	30	23
		15,6	37	44	43	37	31
		7,8	43	57	51	40	41

Так, у роботі Rahmani-Badi та ін., 2014 було показано що суміш ципрофлоксацину (ефективна концентрація 1 мг/мл) та цис-2-деценової кислоти (ефективна концентрація 310 нМ) зменшує адгезію (до 11 та 13 % відповідно) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* на нержавіючій сталі. У іншій праці (Warraich et al., 2020), дослідники показали можливість використання суміші ципрофлоксацину у концентрації 3,75 мкг/мл з амінокислотами глутаматом та аспартатом (концентрація 10 мМ) для зниження адгезії (на 98,6 %) клітин *S. aureus* NCTC 8325.

На наступному етапі досліджували можливість прояву синергізму антиадгезивної активності синтезованих поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ у суміші з ефірними оліями.

4.2. Адгезія мікроорганізмів на абіотичних поверхнях, оброблених комплексом поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 з ефірними оліями

У літературі наявна велика кількість даних щодо використання ефірних олій як ефективних антимікробних агентів (Moreira et al., 2022; Alharthi et al., 2021; Rahim et al., 2023). Разом з тим, не вдалося знайти інформацію щодо антиадгезивної дії таких природних сполук, що, ймовірно, пов'язано з більшим інтересом до дослідження їх здатності до деструкції сформованих біоплівки (Brożyna et al. 2021; Liu et al. 2020; Francisconi et al. 2020) у тому числі у складі сумішей з іншими речовинами (Iseppi et al. 2023).

Так, у праці було показано що суміш ефірної олії чайного дерева (16 мкг/мл) та ванкомицину (32 мкг/мл) руйнує 40,8% біоплівки *Enterococcus faecalis* VAN3. Комбінація ефірної олії чайного дерева з ЕО евкалипту (16 та 4 мкг/мл відповідно) дозволила підвищити ступінь руйнування досліджуваної тест-культури до 58,3% (Iseppi et al. 2023).

Враховуючи наявні у літературі дані щодо антиадгезивного ефекту антибіотиків у субмінімальних концентраціях (Asadi et al., 2019; Rasigade et al. 2011; Dong et al., 2019), припустили, що можна використати даний підхід і

для дослідження синергізму антиадгезивної дії ефірної олій чайного дерева та ПАР штаму ІМВ Ас-5017.

Встановлено, що у разі обробки поверхонь сталі і кахелю, розчином ефірної олій чайного дерева, у концентрації нижчій за їх МІК, спостерігається зниження рівня адгезії *P. vulgaris* БТ-1, *P. sp.* МІ-2, *E. cloacae* С-8 до 50-68% (табл. 4.3).

Використання розчину ефірної олій у концентрації нижчій МІК (див Розділ 3, табл. 3.5) і розчину, синтезованих як на етанолі, так і пересмаженій олій поверхнево-активних речовин (60 мкг/мл) супроводжується зниженням адгезії досліджуваних бактеріальних тест-культур на 72-90%, що вище ніж у разі використання монопрепарату ефірної олій (зменшення адгезії на 50-68%) чи розчину ПАР (зменшення адгезії на 68-77%).

Отже, не дивлячись на відсутність у літературі даних щодо антиадгезивного ефекту монопрепаратів ефірних олій, чи їх комбінації з іншими речовинами, отримані результати свідчать про можливість використання суміші ефірної олій чайного дерева та поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих в різних умовах культивування.

Таблиця 4.3

Прикріплення мікроорганізмів до абіотичних поверхонь оброблених препаратами ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, ефірною олією чайного дерева та їх сумішшю

Субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	Абіотична поверхня	Адгезія (%) за дії препаратів		
			ПАР	ефірної олії	суміші ПАР та ефірної олії
етанол	<i>Proteus vulgaris</i> BT-1	кахель	32	48	28
		сталь	25	32	18
відпрацьована соняшникова олія		кахель	26	48	20
		сталь	22	32	16
етанол	<i>Pseudomonas</i> sp. MI-2	кахель	32	53	21
		сталь	29	42	23
відпрацьована соняшникова олія		кахель	28	53	25
		сталь	25	42	18
етанол	<i>Enterobacter cloacae</i> C-8	кахель	22	50	20
		сталь	26	44	19
відпрацьована соняшникова олія		кахель	23	50	10
		сталь	23	44	12

Примітки: концентрація субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин наведено у розділі 2 «Матеріали та методи»; ефективна концентрація розчинів ПАР, ефірної олії та їх суміші 62,5 мкг/мл.

Висновки до розділу 4.

Встановлено, що незалежно від типу використовуваного субстрату (очищений гліцерин, віхдіх виробництва біодизелю), синтезовані *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 поверхнево-активні речовини проявляють синергізм антиадгезивної активності у суміші з комерційними антибіотиками (ципрофлоксацин, офлоксацин) та ефірною олією чайного дерева.

Досліджувані абіотичні матеріали є одними з найбільш використовуваних у медичних закладах, і як свідчать літературні дані є одним з джерел внутрішньолікарняних інфекцій пов'язаних з адгезією на них патогенних мікроорганізмів.

Обробка абіотичних поверхонь сумішшю ПАР з антибіотиками, або ПАР з ефірною олією дає змогу знизити відсоток адгезії на поверхнях досліджуваних бактеріальних тест-культур, що дає змогу розглядати такі суміші у складі дезенфікуючих засобів.

**РОЗДІЛ 5. ДЕСТРУКЦІЯ БІОПЛІВОК ЗА ДІЇ КОМПЛЕКСУ
ПРИРОДНИХ БІОЦИДІВ З ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ
РЕЧОВИНАМИ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017 І
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241, СИНТЕЗОВАНИМИ
В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ**

Здатність до формування біоплівки забезпечує домінуючий спосіб росту бактерій у природі (Vano et al., 2023). Біоплівки оточені позаклітинним матриксом, що складається з різних шарів полімерів, таких як екзополісахариди, білки, амілоїдогенні білки (Sharma et al., 2019). Клітини в багатошарових біоплівках розташовані щільно одна до одної або в контакті з поверхнею і завдяки властивостям матриці, міжклітинним взаємодіям, впливам молекулярних факторів (наприклад, експресією специфічних генів і білків, необхідних для росту та розвитку бактерій у просторі) такі системи є надзвичайно небезпечними, адже характеризуються підвищеною стійкістю до антимікробних речовин (Vano et al., 2023).

Так, сьогодні біоплівки викликають приблизно 80% хронічних і рецидивуючих інфекцій у людей (Vano et al., 2023). Лише у США вони є етіологічним агентом приблизно 60% усіх хронічних інфекцій: щорічно реєструється 1,96 мільйона випадків, що спричиняє 268 000 смертей і коштує приблизно 18 мільярдів доларів США на пряме лікування таких інфекцій (Rumbaugh et al., 2020).

Особи з медичними імплантатами та іншими пристроями, а також з ослабленим імунітетом на тлі хронічних інфекцій чи імуносупресивної терапії, є в зоні ризику розвитку інфекцій, пов'язаних з біоплівкою (Omar et al., 2017). Така ситуація обумовлює необхідність пошуку шляхів підвищення ефективності класичного підходу антибіотикотерапії та дослідження різноманітних природних сполук, в тому числі і їх комбінацій.

Враховуючи, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *R. erythropolis* IMB Ac-5017 та *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в різних умовах культивування проявляли синергізм антимікробної та антиадгезивної

активності з антибіотиками, антифунгальними препаратами та ефірними оліями, на наступному етапі досліджували їх дію на бактеріальні та дріжджові біоплівки.

5.1. Руйнування біоплівок під впливом суміші поверхнево-активних речовин з антибіотиками

У таблицях 5.1-5.3 наведені дані щодо деструкцій бактеріальних біоплівок за дії монопрепаратів поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на гліцерині різної якості, антибіотиків ципрофлоксацину, офлоксацину та їх суміші.

Встановлено, що незалежно від якості гліцерину, синтезовані штамом ІМВ Ас-5017 ПАР проявляли синергізм з антибіотиками у руйнуванні біоплівок *P. vulgaris* БТ-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2 та *E.cloacae* С-8, при цьому ступінь руйнування біоплівок за дії таких сумішей був вищим ніж у разі використання монопрепаратів поверхнево-активних речовин чи антибіотиків.

Так, наприклад, у разі використання суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих на середовищі з очищеним гліцерином та ципрофлоксацину (у діапазоні концентрації 15,6-125 мкг/мл), ступінь руйнування біоплівки *P. vulgaris* БТ-1, досягав 54-68 %, і був вищим ніж у разі використання лише ПАР (40-55%) чи антибіотику (34-54%) аналогічної концентрації.

Схожі закономірності спостерігали для сумішей ципрофлоксацин/ПАР та офлоксацин/ПАР, отриманих на середовищі з відходами виробництва біодизелю, при цьому ступінь руйнування біоплівки *P. vulgaris* БТ-1 був у 1,2-1,5 раза вищий, ніж у разі використання сполук по-окремоті (табл. 5.1). Також збільшувався відсоток руйнування біоплівок *Pseudomonas* sp. МІ-2 та *E.cloacae* С-8 у разі використання поверхнево-активних речовин, синтезованих на середовищі з очищеним гліцерином у суміші з ципрофлоксацином та офлоксацином.

Таблиця 5.1

Деструкція біоплівки *Proteus vulgaris* БТ-1 за дії монопрепаратів антибіотиків, поверхнево-активних речовин, утворених *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація антимікробних сполук, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		ПАР	ципрофлоксацину	офлоксацину	суміші ципрофлоксацину і ПАР	суміші офлоксацину і ПАР
очищений гліцерин	500	64	64	62	78	70
	250	55	63	60	70	63
	125	55	54	50	68	65
	62,5	53	47	44	59	60
	31,2	47	37	31	52	59
	15,6	40	34	22	54	42
	7,8	33	27	23	43	34
	3,9	20	24	15	27	31
відходи виробництва біодизелю	500	65	64	62	79	74
	250	61	63	60	68	70
	125	60	54	50	65	70
	62,5	54	47	44	57	65
	31,2	52	37	31	52	57
	15,6	43	34	22	47	53
	7,8	37	27	23	40	46
	3,9	30	24	15	37	42

Примітки: табл. 5.1-5.3: склад поживного середовища та концентрація субстратів для синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, наведено у розділі 2 «Матеріали та методи»; під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %.

Так, наприклад, ступінь деструкції біоплівки *Pseudomonas* sp. MI-2 за дії комплексу ПАР та ципрофлоксацину (концентрація 62,5 мкг/мл) та ПАР з офлоксацином (концентрація 62,5 мкг/мл) становив 54 та 51% відповідно і був вищим у разі використання монопрепаратів поверхнево-активних речовин (ступінь руйнування біоплівки 40%), ципрофлоксацину (37%) та офлоксацину (27%) аналогічної концентрації. Заміна очищеного гліцерину на відхід виробництва біодизелю, у середовищі культивування продуцента ПАР дало змогу підвищити відсоток руйнування біоплівки *Pseudomonas* sp. MI-2 за їх дії у комплексі з антибіотиками до 80% (табл 5.2).

Аналогічні закономірності спостерігали у разі деструкції біоплівки *E. cloacae* C-8, при цьому ступінь руйнування такої біоплівки у разі використання суміші ПАР, отриманих як на очищеному гліцерині, так і відходах виробництва біодизелю з антибіотиками в діапазоні досліджуваних концентрацій (3,8-500 мкг) становив в середньому 22-83%, і був вищим ніж для лише ПАР (19-69%), та антибіотиків (19-50%).

Обговорення отриманих результатів. У літературі наявні відомості щодо руйнування біоплівок за дії мікробних поверхнево-активних речовин (Giri et al., 2018; Allegrone et al. 2021; Elshikh et al., 2017) та комплексу ПАР з антибіотиками (Chen et al., 2019). Так, до прикладу, ліпопептиди синтезовані лштамами *Bacillus subtilis* VSG4 та *Bacillus licheniformis* VS16 у концентрації 500 мкг/мл діють на сформовану біоплівку *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, та *Bacillus cereus* ATCC. При цьому, відсоток руйнування становив 63–80% для ПАР, синтезованих *B. subtilis* VSG4 та 61–68% *B. licheniformis* VS16 для (Giri et al., 2018).

Ди-рамноліпіди, синтезовані *Burkholderia thailandensis* E264 (ATCC 700388) у концентрації 75 мкг/мл руйнували (на 60-85%) біоплівку *Streptococcus oralis* та *Streptococcus sanguinis* (Elshikh et al., 2017).

Рамноліпіди, синтезовані *P. aeruginosa* 89 при рості на глюкозі у концентрації 2 мг/мл на 84,6% руйнували біоплівку *S. aureus* 6538 і були більш ефективними деструкторами синтетичні ПАР ніж Tween® 80 and

Triton™ X-100, при обробці якими ступінь руйнування становив 41,5 та 42,3% відповідно (Allegrone et al., 2021).

У роботі (Chen et al., 2019) встановили можливість використання суміші антибіотику амікацину (0,06 мг/мл) з рамноліпідами (153,6 мкг/мл), синтезованими *Pseudomonas aeruginosa* (штам не вказано) на глюкозі у руйнуванні біоплівки *Helicobacter pylori*. При цьому, ступінь деструкції становили 90%. Зазначимо, що при використанні препаратів окремо, ступінь руйнування біоплівки не перевищував 40%.

Зазначимо, що у роботах (Giri et al., 2018; Elshikh et al., 2017; Allegrone et al., 2021; Chen et al., 2019) як джерело вуглецю при культивуванні штамів продуцентів ПАР для дослідження їх здатності до деструкції біоплівок використовували глюкозу. При цьому наявні у літературі дані щодо можливості використання промислових відходів є обмеженими і стосуються здебільшого можливості біоконверсії високих концентрацій джерела вуглецю (Souza et al., 2016; Nazareth et al., 2020), а не дослідженні їх властивостей, що несе поненційне обмеження використання таких метаболів у різних схерах.

5.2. Деструкція біоплівок дріжджів за дії суміші поверхнево-активних речовин та антифунгальних препаратів

Кандидоз є одним з найпоширеніших грибкових інфекцій, і його захворюваність зросла за останні кілька десятиліть в основному в результаті зростання популяції груп ризику, включаючи пацієнтів з медичними показаннями та пацієнтів з ослабленим імунітетом (Di Vito et al., 2023; El-Baz et al., 2023). Незважаючи на те, що *Candida albicans* все ще є відповідальною за більшість інфекцій, зростає кількість повідомлень про патогенез інших види, включаючи *C. tropicalis* (Li et al., 2023). При цьому, близько 80% проявів інфекцій, викликаних *Candida*, пов'язані з етіологією біоплівки, які являють собою консорціум клітин, прикріплених до поверхні та огорнутих матрицею екзополімерних речовин, захищені від різноманітних впливів навколишнього середовища, в тому числі і антифунгальних засобів (Di Vito et al., 2023; El-Baz et al., 2023).

Деструкція біоплівки *Pseudomonas sp.* МІ-2 за дії антибіотиків, поверхнево-активних речовин *R. erythropolis*

ІМВ Ас-5017 та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація антимікробних сполук, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		ПАР	ципрофлораксацину	офлоксацину	суміші ципрофлораксацину і ПАР	суміші офлоксацину і ПАР
очищений гліцерин	500	65	50	49	73	75
	250	60	51	41	65	67
	125	52	45	32	59	59
	62,5	40	37	23	51	54
	31,2	33	37	25	43	47
	15,6	25	34	22	40	31
	7,8	20	23	17	29	31
	3,9	19	18	10	26	23
відходи виробництва біодизелю	500	69	50	49	79	80
	250	61	51	41	69	71
	125	61	45	32	69	74
	62,5	51	37	23	55	64
	31,2	50	37	25	50	53
	15,6	41	34	22	48	53
	7,8	31	23	17	34	47
	3,9	25	18	10	23	39

Таблиця 5.3

Дія на біоплівку *Enterobacter cloacae* C-8 поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація антимікробних сполук, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		ПАР	ципрофлоксацину	офлоксацину	суміші ципрофлоксацину і ПАР	суміші офлоксацину і ПАР
очищений гліцерин	500	63	60	47	78	74
	250	55	55	44	66	58
	125	53	43	36	59	53
	62,5	46	39	28	58	48
	31,2	44	33	21	48	39
	15,6	32	25	20	37	39
	7,8	28	22	16	32	30
	3,9	23	17	8	26	27
відходи виробництва біодизелю	500	65	60	47	83	24
	250	61	55	44	73	69
	125	58	43	36	66	56
	62,5	51	39	28	58	59
	31,2	45	33	21	43	42
	15,6	43	25	20	38	32
	7,8	25	22	16	26	29
	3,9	20	17	8	22	25

Тому перспективним є дослідження нових антифунгальних засобів, в тому числі і комбінації комерційних протигрибкових сполук, для боротьби з біоплівками представників роду *Candida*.

У таблиці 5.4 та 5.5 наведені дані щодо синергізму руйнування біоплівок *C.albicans* Д-6 та *C. tropicalis* PE-2 за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 в різних умовах культивування, антифунгальних препараті клотримазолу та флуконазолу і їх суміші.

Встановлено, що незалежно від умов культивування, синтезовані поверхнево-активні речовини ефективно руйнували біоплівки досліджуваних тест-культур та проявили синергізм руйнування у суміші з клотримазолом та флуконазолом. Варто зазначити, що найвищий відсоток руйнування біоплівок як *C.albicans* Д-6 так і *C. tropicalis* PE-2 спостерігали у разі використання поверхнево-активних речовин, синтезованих на базовому середовищі (табл. 5.5 та 5.6). Такі дані, корелюють з даними антимікробної активності синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 ПАР (див розділ 3, пункт 3.2), одержаних на базовому та модифікаційних середовищах і підтверджують взаємозв'язок антимікробної активності та ступеня руйнування біоплівок.

Щодо отриманих результатів, було показано, що у разі використання поверхнево-активних речовин, синтезованих на усіх середовищах, у суміші з антифунгальними речовинами підвищувався у 1,1-1,6 разів відсоток руйнування біоплівки *C.albicans* Д-6 та *C. tropicalis* PE-2 у порівнянні з використанням лише клотримазолу чи флуконазолу.

Окрім цього, варто зазначити, що використання таких сумішей дає змогу не лише підвищити ефективність їх використання, а і зменшує ймовірність розвитку резистентності, через багатоконпонентний склад таких сумішей (наприклад мікробні ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 є комплексом гліко-, фосфо- аміно- та нейтральних ліпідів), різний механізм дії і субмінімальні інгібуючі концентрації сполук у суміші.

Обговорення отриманих результатів. У літературі наявні відомості щодо руйнування біоплівок дріжджів видів *Candida* за дії суміші флуконазолу і стосуються переважно його використання з природними сполуками (Li et al., 2020; Wang et al., 2019; Yong et al., 2020; Zhu et al., 2022).

Так, у разі використання суміш флуконазолу (16 мкг/мл) з псевдоларовою кислотою (2 мкг/мл), ступінь руйнування біоплівки *C. tropicalis* ATCC 750 становив 80,3%, тоді як аналогічний ступінь досягався за дії монопрепаратів у концентрації 256 мкг/мл та 64 мкг/мл відповідно (Li et al., 2020).

Пальматин – ізохіноліновий алкалоїд, який можна виділити з лікарської рослини *Rhizoma Coptidis* і *Mahonia aquifolium* у суміші з флуконазолом проявляє синергізм руйнування біоплівки *C. tropicalis* GDM2.147, при цьому концентрація пальматину та флуконазолу становить 8 та 256 мкг/мл (Wang et al., 2019).

Берберин, активний компонент, отриманий з рослини *Coptis chinensis*, яка є поширеною традиційною китайською лікарською травою проявляє синергізм у руйнуванні біоплівки *C. albicans* 0253. Так, у разі використання суміші берберину (2 мкг/мл) та флуконазолу 91 мкг/мл спостерігали інгібування 76% утвореної штамом 0253 біоплівки. При цьому, що відсуток руйнування біоплівки досліджуваної тест-культури за дії монокомпонентів аналогічної концентрації становив лише 43% (Yong et al., 2020). Також ці результати дали змогу дослідникам припустити, що суміш антибіотику та берберину може бути ключовим фактором індукції високого вмісту цитоплазматичного Ca^{2+} . Так, внутрішньоклітинний кальцій тісно пов'язаний з регуляцією стресових реакцій, стійкістю до протигрибкових препаратів і морфогенетичною конверсією філаментів у *C. albicans*. Цитоплазматичний Ca^{2+} у *C. albicans* зазвичай низький, адже високий вміст його в цитоплазмі призводить до токсичності та загибелі клітин. Згідно з результатами аналізу кальцію в цитоплазмі, флуконазол сам по собі не зміг порушити гомеостаз Ca^{2+} а суміш збільшила цитоплазматичний Ca^{2+} (Yong et al., 2020).

**Деструкція біоплівки *Candida albicans* Д-6 за дії поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241,
флуконазолу, клотримазолу та їх суміші**

Середовище для синтезу ПАР	Антифунгальна сполука	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії антифунгальної сполуки концентрацією					
		118	59	29,5	14,7	7,3	3,6
базове	ПАР	60	51	47	37	24	22
	ПАР в суміші з флуконазолом	80	68	56	43	38	31
	ПАР в суміші з клотримазолом	78	64	60	51	43	35
середовище 1	ПАР	54	47	45	35	33	25
	ПАР в суміші з флуконазолом	69	57	48	42	36	25
	ПАР в суміші з клотримазолом	63	50	45	32	25	20
середовище 2	ПАР	54	43	34	30	24	21
	ПАР в суміші з флуконазолом	67	60	56	47	34	25
	ПАР в суміші з клотримазолом	66	59	51	46	32	22
середовище 3	ПАР	58	42	40	34	21	18
	ПАР в суміші з флуконазолом	62	60	51	43	36	31
	ПАР в суміші з клотримазолом	64	59	50	44	34	30

Примітка: табл. 5.4–5.6: склад базового середовища та середовищ 1–3 наведено у розділі 2 «Матеріали і методи», як джерело вуглецю для синтезу ПАР використовували відпрацьовану після смаження картоплі фри соняшникову олію у концентрації 2 % (об'ємна частка); під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5%; ступінь руйнування біоплівки *C. albicans* Д-6 за дії клотримазолу та флуконазолу у діапазоні концентрацій 3,6-118 мкг/мл становив 28-49 та 25-53 % відповідно

Руйнування біоплівки *Candida tropicalis* PE-2 за дії поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241, флуконазолу, клотримазолу та їх суміші

Середовище для синтезу ПАР	Антифунгальна сполука	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії антифунгальної сполуки концентрацією					
		118	59	29,5	14,7	7,3	3,6
базове	ПАР	69	55	45	40	34	28
	суміш ПАР та флуконазолу	89	72	65	54	48	36
	суміш ПАР та клотримазолу	85	74	70	61	53	45
середовище 1	ПАР	63	49	43	40	36	28
	суміш ПАР та флуконазолу	74	63	57	50	46	38
	суміш ПАР та клотримазолу	72	60	55	43	36	28
середовище 2	ПАР	61	50	49	36	28	21
	суміш ПАР та флуконазолу	71	70	61	50	44	32
	суміш ПАР та клотримазолу	76	65	61	56	43	35
середовище 3	ПАР	60	40	40	35	34	27
	суміш ПАР та флуконазолу	73	70	61	54	49	34
	суміш ПАР та клотримазолу	76	65	58	46	35	29

Примітка: ступінь руйнування біоплівки *C. tropicalis* PE-2 за дії клотримазолу та флуконазолу у діапазоні концентрацій 3,6-118 мкг/мл становив 31-52 та 33-56 % відповідно

Флуконазол (16 мкг/мл) у суміші з псевдоларовою кислотою А (16 мкг/мл), що являє собою дитерпеноїд, який в основному отримують із соснової кори (*Pseudolarix kaempferi*) руйнує на 80% біоплівку *C. albicans* ATCC 90028 (Zhu et al., 2022).

Враховуючи наявні дані щодо використання суміші, один з компонентів якої є рослинним, також досліджували вплив ефірних олій у суміші з мікробними ПАР на руйнування біоплівок дріжджів.

5.3. Вплив комплексу ефірних олій з поверхнево-активними речовинами на деструкцію біоплівок

Встановлено, що незалежно від умов культивування, синтезовані поверхнево-активні речовини, окрім синергізму руйнування біоплівок у суміші з антифунгальними препаратами (див пункт 5.2) проявляли ефект у руйнуванні біоплівок у комбінації з ефірними оліями у широкому діапазоні досліджуваних концентрацій (3,6-472 мкг/мл). Для, прикладу, у таблиці 5.3 наведено дані щодо деструкції біоплівок досліджуваних тест-культур у разі використання монопрепаратів ПАР, ефірних олій та їх суміші у концентрації 59 мкг/мл.

Показано, що за використання суміші ПАР та ефірної олії як кориці, так і лемонграсу, ступінь руйнування біоплівок *C. albicans* Д-6 та *C. tropicalis* РЕ-2 становив 64-88 та 65-80% відповідно і був вищим ніж у разі використання лише ПАР (42-52%), ефірної олії кориці (35 та 44%) чи лемонграсу (39 та 50%). Значимо, що зі зниженням концентрації сполук у суміші, зниження ступеня руйнування біоплівок було не значним (в середньому спунь руйнування біоплівок досліджуваних тест-культур залишався на рівні 32-51%) і був вищим ніж такий встановлений лише для ПАР (22-34%) чи ефірних олій (20-27%).

Обговорення отриманих результатів. Наявні у літературі роботи стосуються переважно досліджень здатності до руйнування біоплівок монопрепаратів ефірних олій кориці та лемонграсу або ж їх основних компонентів (Wijesinghe et al., 2021; Miranda-Cadena et al., 2021; El-Baz et al.,

2021), поодинокі роботи стосуються їх використання у суміші з антибіотиками (Pandurang et al., 2018; Shamim et al., 2023). Проте основна частина праць заснована на дослідженні багатокомпонентного складу ефірних олій (ЕО) що свідчить про те, що в їх біологічних ефектах, в тому числі і у здатності до руйнування біоплівки, беруть участь декілька механізмів (Rahim et al., 2023).

Так, в огляді (Saviuc et al., 2015) показано, що ефірні олії є потужними антибіоплівковими агентами, діючи шляхом інгібування у патогенів систем міжклітинного зв'язку та індукуювання змін у субстраті (що стосується зміни окислювально-відновного потенціалу, питомого опору або рН).

Дослідження, описані у роботі (Selim, et al., 2014), показали, що відсутність зовнішньої мембрани у грампозитивних бактерій сприяє прямій взаємодії ефірних олій кепарису з клітинною мембраною, впливаючи на її проникність і викликаючи витік внутрішньоклітинного вмісту або інактивацію бактеріальних ферментів.

Melo et al. 2019 зазначали, що дія ЕО *Ocimum gratissimum* (ефірна олія васильку) на біоплівку *S. aureus* P5 залежить від гідрофобності, реакційної здатності та швидкості дифузії ефірної олії в матриці, а також від складу та структури біоплівки.

Tang та інші проаналізували дію ефірної олії кардамону *Amomum villosum* Lour щодо метицилін-резистентного штаму *S. aureus* ATCC 43300 і встановили, що при зниженні гідрофобності знижується і адгезія бактерій до інертних поверхонь. Дослідники здійснили перше протеомне дослідження механізму дії ефірної олії кардамону щодо патогена та показали, що інгібуючий ефект залежить від концентрації ефірної олії (Tang et al., 2020)

ЕО також можуть збільшувати окислювальний стрес у мікробних клітинах, викликаючи пошкодження внутрішньоклітинних макромолекул, що призводить до клітинного апоптозу. Наприклад, Das та ін. виявили, що ЕО ромашки індукуює накопичення активних форм кисню (супероксиду та

пероксида), які можуть відповідати за антимікробну активність цієї ефірної олії (Das, et al., 2019).

Ефірної олії кориці та лемонграсу пригнічують біосинтез ергостеролу у видів *Candida*, що впливає на цілісність мембрани шляхом пермеабілізації клітини (Veilleux et al., 2019). Такий механізм дії обумовлений багатим компонентним складом таких олій, зокрема наявність терпеноїдів фенольної природи, спиртів, альдегідів. Взаємозв'язок складу і властивосте й ефірних олій був підтверджений у роботі (Pandurang et al., 2018). Науковці досліджували вплив різних компонентів ефірної олії лемонграсу на їх здатність у вигляді моносполук чи у комплексі з антибіотиком руйнувати біоплівки дріжджів. Так, було встановлено, що новий компоненти ефірної олії лемонграсу ліналол (0,064 мг/мл) у суміші з флуконазолом (0,125 мг/мл) повністю інгібує біоплівку *C. albicans* ATCC 90028. Подібний ефект спостерігали і у разі використання іншого компонента цієї олії цитралу (0,008 мг/мл) у суміші з флуконазолом (0,062 мг/мл). При цьому, використання компонентів по-одиноці, у зазначених вище концентраціях руйнувало лише на 37 та 32% сформовану біоплівку тест-культури.

У роботі (Shamim et al., 2023) було встановлено, що за додавання ефірної олії коциці (32 мкг/мл) у суміш з мупіроцино (32 мкг/мл) у співвідношенні 1:1 підвищується з 14 до 58,6% ступінь руйнування біоплівки *C. albicans* ATCC 10231. Аналогічні закономірності спостерігали і у разі додавання олії кориці до флуконазолу (концентрації компонентів у суміші 64 мкг/мл), при цьому ступінь руйнування біоплівки становив 61,1% і був вищим ніж у разі використання лише розчину флуконазолу (6%) аналогічної концентрації.

Варто зазначити, що у літературі відсутні дані щодо деструкції біоплівок, за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих представниками родів *Acinetobacter* та *Rhodococcus*, разом з тим наявні дані щодо синергічної дії, суміш поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* IMB B-7405 з ефірними оліями кориці та лемонграсу на дріжджові біоплівоки. Так, у разі

використання монопрепаратів Як ПАР, так і ефірних олій кориці і лемонграсу найвищий ступінь (43–60%) руйнування біоплівки *C. tropicalis* PE-2 та *C. albicans* Д-6 спостерігали за концентрації 150 мкг/мл, в той час як використання суміші (у аналогічній концентрації, співвідношення 1:1) цих сполук супроводжувалося підвищенням ступеня руйнування біоплівки до 70 % (Pirog, Kliuchka, & Kliuchka, 2019).

Отримані у даній роботі нижчі значення ефективної концентрації монопрепаратів ПАР (59 мкг/мл) та їх суміші з ефірними оліями можуть бути обумовлені різним складом синтезованих поверхнево-активних речовин, на який безпосередньо впливають умови культивування продуцента.

Деструкція біоплівок дріжджів за дії поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, ефірної олії кориці, лемонграсу та їх суміші

Середовище для синтезу ПАР	Тест-культура	Деструкція біоплівок (%) за дії		
		ПАР	суміші ПАР з ефірною олією кориці	суміші ПАР з ефірною олією лемонграсу
базове	<i>Candida albicans</i> Д-6	51	88	80
	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	55	73	69
середовище 1	<i>Candida albicans</i> Д-6	47	70	65
	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	49	76	68
середовище 2	<i>Candida albicans</i> Д-6	43	64	70
	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	50	70	77
середовище 3	<i>Candida albicans</i> Д-6	42	71	72
	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	52	80	70

Примітка: ефективна концентрація препаратів ПАР, ефірної олії кориці, лемонграсу та їх суміші становила 59 мкг/мл. Ступінь руйнування біоплівки *C. albicans* Д-6 та *C. tropicalis* РЕ-2 за дії ефірної олії кориці становив 35 та 44% відповідно, а за дії ефірної олії лемонграсу – 39 та 50%

Висновки до розділу 5

Встановлено, що синтезовані в різних умовах культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 та *R. erythropolis* IMB Ас-5017 поверхнево-активні речовини, проявляють синергізм руйнування бактеріальних та дріжджових біоплівочок у суміші з комерційними антибіотиками (флоксацином, ципрофлоксацином), антифунгальними препаратами (клотримазолом, флуконазолом) та ефірними оліями кориці і лемонграсу.

Використання таких сумішей сполук дає змогу не лише підвищити відсоток руйнування біоплівочок у порівнянні з використанням монопрепаратів, а й знизити ефективні концентрації сполук у суміші до субінгібуючих, що в подальшому мінімізує появу стійких форм мікроорганізмів.

**РОЗДІЛ 6. ДІЯ НА ДВОВИДОВІ БІОПЛІВКИ КОМПЛЕКСУ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS*
ERYTHROPOLIS IMB Ac-5017 I *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*
IMB B-7241 З ЕФІРНИМИ ОЛІЯМИ**

Все частіше у літературі з'являється інформація щодо досліджень спільного культивування продуцентів практично цінних метаболітів з іншими, конкурентними мікроорганізмами як фактор збільшення синтезу кінцевих речовин (Alves et al., 2019; Chen et al., 2022) або збільшення спектру їх біологічної активності (Alves et al., 2019; Hamza et al., 2018; Gómez et al., 2016).

Разом з цим, доведено, що активність генів відповідальних за біосинтетичні процеси при спільному культивуванні мікроорганізмів напряму залежить від кількості культур (зокрема динаміка синтезу метаболітів і їх активність є найвищою за культивування двох мікроорганізмів) у спільноті і їх видового складу (Chevrette et al., 2022).

При цьому, бактерії-індуктори, використовувані більшістю дослідників, є патогенними або умовно-патогенними (Selegato et al. 2023; Caudal et al. 2022; Xu et al. 2023), що унеможливорює масштабування такого процесу. При цьому інформація, щодо використання непатогенних представників, зокрема дріжджів роду *Saccharomyces* як індукторів для регуляції біологічної активності синтезованих метаболітів відсутня.

Ще одним з важливих факторів, який впливає на синтез та властивості мікробних метаболітів є фізіологічний стан індуктора. Найчастіше використовують живі клітини або супернатант (Caudal et al. 2022; Xu et al. 2023), рідше інактивовані тепловою обробкою клітини (Selegato et al. 2023) При цьому у роботах відсутня комплексний аналіз впливу фізіологічного стану на властивості кінцевого продукту.

Тому, мета даної роботи було дослідити вплив фізіологічного стану клітин еукаріотичного індуктора *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1 на антимікробну активність, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R.*

erythropolis ІМВ Ас-5017 поверхнево-активних речовин та визначити їх синергічну дію та здатність до руйнування двовидових біоплівки у комплексі з ефірними оліями (ЕО).

6.1. Біологічна активність поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності еукаріотичного індуктора у різному фізіологічному стані

На першому етапі досліджували можливість регуляції антимікробної активності ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 шляхом впливу фізіологічного стану (живі, інактивовані клітини, супернатант) індуктора (табл. 6.1-6.2) .

Встановлено, що незалежно від фізіологічного стану індуктора (інактивовані клітини, супернатант, живі), синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 поверхнево-активні речовини виявилися ефективними антимікробними агентами щодо бактеріальних і дріжджових тест-культур (табл 6.1). Отримані значення мінімальних інгібуючих концентрацій ПАР штаму ІМВ В-7241, синтезованих на наявності еукаріотичного індуктора у різному фізіологічному стані показали, що найефективнішим є використання саме живих клітини *S. cerevisiae* БТМ-1. Так, їх внесення у поживне середовище з різними вуглецевими субстратами (очищений гліцерин, відходи виробництва біодизелю) супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо *E. cloacae* С-8, *P. vulgaris* ПА-12, *S. aureus* БМС-1 були у 9-81 раз нижчими, порівняно зі значеннями МІК ПАР, одержаних без індуктора. Зазначимо, що за наявності індуктора у середовищі культивування штаму ІМВ В-7241 у вигляді супернатанту та інактивованих клітин, значення МІК ПАР щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур були у 5- 57 та у 3-33 рази нижчими, ніж мінімальні інгібуючі концентрації поверхнево-активних речовин, одержаних без індуктора (табл. 6.1).

Вплив фізіологічного стану індуктора у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на активність синтезованих поверхнево-активних речовин

Субстрат для одержання ПАР	Фізіологічний стан індуктора	Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР (мкг/мл) щодо				
		<i>Proteus vulgaris</i> PA-12	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	<i>Candida albicans</i> Д-6
гліцерин очищений	живі клітини	0,85	1,7	3,4	0,85	3,4
	супернатант	2,9	5,9	5,9	1,7	2,9
	інактивовані клітини	4,8	9,6	9,6	2,4	9,6
	контроль (без індуктора)	31,3	62,7	31,3	62,7	125
відхід виробництва біодизелю	живі клітини	2,1	2,1	1,05	1,05	1,05
	супернатант	3,0	6,0	1,5	3,0	6,0
	інактивовані клітини	5,2	10,4	5,2	2,6	10,4
	контроль (без індуктора)	85	85	42,5	85	170

Примітка. Концентрація очищеного гліцерину та відходів виробництва біодизелю у середовищі культивування штаму ІМВ В-7241 становила 3 та 5% (об'ємна частка) відповідно. **Табл 6.1-6.2:** під час визначення МІК похибка не перевищувала 5%

У разі дослідження антифунгальної активності синтезованих ПАР. Так, МІК поверхнево-активних речовин, утворених за внесення живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, щодо *C.tropicalis* РЕ-2 та *C. albicans* Д-6 був у 37 – 162 рази нижчими, ніж МІК поверхнево-активних речовин, одержаних без індуктора, найвищі значення МІК одержали (МІК 2,4 – 10,4 мкг/мл) одержали у разі використання ПАР, синтезованих за попереднього внесення інактивованих клітин індуктора.

Аналогічний ефект спостерігали у разі внесення у середовище культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 живих, інактивованих клітин та супернатанту клітин *S. cerevisiae* БТМ-1. При цьому найнижчі показники МІК ПАР (5-40 мкг/мл) були встановлені у разі використання живих клітин індуктора щодо як бактеріальних тест-культур (*Pseudomonas* sp. МІ-2, *E. coli* ІЕМ-1, *S.aureus* БМС-1) так і дріжджових (*C. albicans* Д-6, *C. utilis* БВС-65) тест культур, порівняно з такими встановленими для контролю (75-300 мкг/мл).

У той же час додавання у середовище культивування індуктора у вигляді інактивованих клітин загалом не вплинуло на антимікробну активність ПАР щодо досліджуваних бактерій (МІК 170-340 мкг/мл), але супроводжувалося синтезом ПАР з вищою щодо дріжджових тест-культур антимікробною активністю (МІК становили 21,3-170 мкг/мл проти 300 мкг/мл для препаратів, утворених без індуктора).

Обговорення отриманих результатів. Наявні у літературі праці стосуються переважно впливу еукаріотичного індуктора на концентрацію синтезованих ПАР (Chen et al., 2021; Fifani et al., 2022; Wang et al., 2021), і лише у поодиноких роботах на властивості (Bai et al., 2022; Ramchandran et al., 2020). Щодо фізіологічного стану клітин індуктора то переважна більшість праць стосується використання живих клітин (Luti et al., 2018; Ohadi et al., 2019;) або супернатанту (Wang et al. 2013), рідше термічно інактивованих або автоклавованих клітин (Ramchandran et al., 2020). Слід

зазначити, що тривають дискусії щодо ефективності використання живих клітин, порівняно з супернататом чи інактивованими.

Таблиця 6.2

Антимікробна активність ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у середовищі з дріжджовим індукторами

Фізіологічний стан індуктора	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо				
	<i>Escherihia coli</i> ІЕМ-1	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Pseudomonas sp.</i> МІ-2	<i>Candida utilis</i> БВС-65	<i>Candida albicans</i> Д-6
живі клітини	10	40	40	10	5
супернатант	10,3	82,5	41,2	41,2	82,5
інактивовані клітини	340	340	170	21,2	170
контроль (без індуктора)	300	300	300	300	300

Примітка: як джерело вуглецю для культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка).

Так, у роботі (Luti et al., 2018) було показано, що незалежно від фізіологічного стану *Saccharomyces cerevisiae* (живі чи інактивовані клітини індуктора) концентрація, синтезованого *Pseudomonas aeruginosa* феназину активно зростала і складала 14,4 або 29,8 мг/л відповідно, що було вищим, порівняно із такою, встановленою для монокультури монокультури (7,6 мг/л). У роботі (Wang et al. 2013) показано, у разі внесення у поживне середовище продуцента натаміцину *Streptomyces natalensis* НV-2 супернатату дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* AS 23451 та грибів *Penicillium chrysogenum* AS 35163, *Aspergillus niger* AS 36472 та збільшувалася концентрація синтезованого антибіотику до 0,7 г/л 1,84; 1,62 і, що було вищим, ніж при внесенні живих клітин індукторів (0,639, 0,875 та 0,799 г/л) відповідно.

У літературі немає відомостей про те, як еукаріотичні клітини впливають на біологічну активність ПАР, але є дані про вплив бактеріальних індукторів. Так, раніше, нами було встановлено, що внесення інактивованих клітин *B. subtilis* БТ- і 2 *E. coli* ІЕМ-1 у середовище культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 підвищує антимікробну активність синтезованих

ПАР: МІК щодо *B. subtilis* БТ-2, *S. aureus* БМС-1, *E. coli* ІЕМ-1 і був у 8-32 рази нижчим, ніж у разі використання контролю (препарти ПАР, синтезовані без індуктора).

Пирог та ін. показали що разі внесення живих клітин *B. subtilis* БТ-2 у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезувалися ПАР антимікробна активність яких щодо бактерій і дріжджів була в 5-20 разів нижчою ніж мінімальна інгібуюча концентрація ПАР, одержаних без клітин індуктора (Пирог та ін, 2020).

У роботі (Пирог, Никитюк, Макеєнко, шевчук, & Іутинська, 2017) було показано, що збільшення антимікробної та антифунгальної активності активності синтезованих ПАР за присутності у середовищі культивування *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 живих та інактивованих клітин *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2. Мінімальні інгібуючі концентрації синтезованих у таких умовах поверхнево-активних речовин були у 2 – 13 разів нижчим, ніж для ПАР, отриманих без індуктора. При цьому ПАР, синтезовані за наявності саме живих клітин (як *E. coli* ІЕМ-1 так і *B. subtilis* БТ-2) виявилися більш ефективними (МІК 6 – 30 мкг/мл), ніж синтезовані за наявності інактивованих клітин індукторів (МІК 12 – 50 мкг/мл)

Отже, отримані результати є порівняльними з наведеними у літературі і дають змогу розглядати поверхнево-активні речовини, синтезовані за наявності біологічних індукторів як ефективні антимікробні та антифунгальні агенти.

6.2. Роль суміші ефірних олій з поверхнево-активними речовинами *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованими за наявності індуктора, у деструкції двовидових біоплівок

Біоплівки в природних умовах являються собою багатовидові системи, що характеризуються підвищеною резистентністю до дії «класичних» антибактеріальних препаратів, що створює необхідність пошуку альтернативних сполук, якими можуть бути суміші природних речовин.

Варто зазначити, що використання суміші двох або більше природних антимікробних агентів відкриває перспективні можливості для їх застосування у лікуванні інфекційних захворювань, оскільки комбінації сполук що проявляють синергізм можуть зменшити ймовірність появи стійких форм патогенів, проявляючи при цьому ефективні фармакологічні властивості (Cheesman et al., 2017).

За останні роки у літературі з'явилася досить велика кількість праць щодо синергізму біологічної активності ефірних олій (ЕО) з антибіотиками (Asadi et al., 2023; Parker et al., 2022; Iseppi et al., 2023), в той же час відсутні дані щодо використання ефірних олій з поверхнево-активними сполуками, отриманими за наявності у середовищі продуцента індукторів, зокрема дріжджових.

Тому, на наступному етапі досліджували здатність до деструкції двовидових біоплівки суміші ЕО із ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованими за внесення живих клітин клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовище із гліцерином різного ступеня очистки.

У таблицях 6.3-6.5 наведені результати деструкції двовидових біоплівок за дії ПАР, утворених *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності у середовищі культивування живих клітин еукаріотичного індуктора та ефірної олії чайного дерева.

Так, встановлено що у разі використання ПАР, синтезованих як на гліцерині очищеному, так і відходах виробництва біодизелю за присутності клітин штаму БТМ-1 у суміші ефірною олією чайного дерева ступінь руйнування двовидової біоплівки *B. subtilis* БТ-2 і *S. aureus* БМС-1 був у 1,1 – 1,5 рази вищим порівняно із використання ПАР чи ефірної олії окремо (табл 6.3).

Встановили, також що за використання суміші ПАР, утворених на середовищі як з гліцерином очищеним, так і відходами виробництва біодизелю за внесення живих дріжджових клітин та ефірної олії чайного дерева збільшує і ступінь руйнування двовидової біоплівки *E. cloacae* С-8 і

Таблиця 6.3

Руйнування двовидової біоплівки *B. subtilis* БТ-2 і *S. aureus* БМС-1, за дії ефірної олії чайного дерева, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності клітин еукаріотичного індуктора ПАР та їх суміші

Антимікробна сполука	Субстрат для синтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування продуцента ПАР	Деструкція біоплівки (%) за дії антимікробних сполук концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
ЕО чайного дерева	–	–	90	81	61	62	50	41
ПАР	очищений гліцерин	–	67	54	49	45	36	33
		+	56	52	49	50	45	37
	відходи виробництва біодизелю	–	69	55	49	45	42	36
		+	70	63	54	50	44	38
суміш ПАР та ефірної олії чайного дерева	очищений гліцерин	–	73	63	52	48	43	33
		+	83	66	52	47	46	38
	відходи виробництва біодизелю	–	99	84	63	50	49	43
		+	87	81	68	66	53	46

Примітка: концентрація очищеного гліцерину та відходів виробництва біодизелю у середовищі культивування штаму ІМВ В-7241 становила 3 та 5% (об'ємна частка) відповідно. Індуктор вносили у вигляді живих клітин.

Табл 6.3-6.5: під час визначення ступеня деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5%.

Таблиця 6.4

Руйнування двовидової біоплівки *E. cloacae* С-8 і *P. vulgaris* РА-12, за дії ПАР, отриманих при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1, ефірної олії чайного дерева та їх суміші

Антимікробна сполука	Субстрат для одержання ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування продуцента ПАР	Деструкція біоплівки (%) за дії антимікробних сполук концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
ЕО чайного дерева	–	–	95	67	57	35	35	34
ПАР	очищений гліцерин	–	52	50	46	35	26	22
		+	67	57	50	39	43	40
	відходи виробництва біодизелю	–	70	59	57	46	47	41
		+	70	64	60	55	48	43
суміш ПАР та ефірної олії чайного дерева	очищений гліцерин	–	87	72	61	59	47	44
		+	98	85	74	63	54	50
	відходи виробництва біодизелю	–	91	87	72	58	54	40
		+	90	74	67	60	55	43

Таблиця 6.5

Руйнування бактеріально-дріжджової біоплівки *C. albicans* Д-6 та *B. subtilis* БТ-2, за дії монопрепаратів ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності індуктора, ЕО чайного дерева та їх комплексу

Антимікробна сполука	Субстрат для одержання ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування продуцента ПАР	Деструкція біоплівки (%) за дії антимікробних сполук концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
ЕО чайного дерева	–	–	99	92	57	49	35	27
ПАР	очищений гліцерин	–	56	54	44	40	34	24
		+	65	56	50	47	41	23
	відходи виробництва біодизелю	–	100	88	54	46	32	26
		+	97	84	56	55	44	39
суміш ПАР та ефірної олії чайного дерева	очищений гліцерин	–	65	51	50	47	41	35
		+	100	73	56	49	44	40
	відходи виробництва біодизелю	–	100	100	59	54	48	40
		+	98	86	75	61	50	45

P. vulgaris ПА-12 (табл. 6.4). Так, ступінь деструкції такої біоплівки у діапазоні досліджуваних (15,6-500 мкг/мл) концентрацій був в 1,1 – 1,6 разів вищим, ніж за дії монопрепаратів ПАР та у 1,1 – 1,8 разів вищим ніж для ефірної олії (табл 6.4).

Аналогічні закономірності підвищення ступеня руйнування бактеріально дріжджової біоплівки утвореної *B. subtilis* БТ-2 і *C. albicans* Д-6 спостерігали у разі використання суміші ЕО чайного дерева та ПАР, утворених на середовищі з різного ступеня очистки гліцерину за наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1. Так, наприклад, використання суміші ЕО чайного дерева і ПАР, синтезованих як на гліцерині очищеному у діапазоні концентрацій 15,6 – 125 мкг/мл, підвищувало ступінь руйнування біоплівки *C. albicans* Д-6 та *B. subtilis* БТ-2 до 1,3-1,7 разів, порівняно із дією монопрепаратів ефірної олії (табл. 6.5).

6.3. Деструкція комбінованих біоплівок за дії комплексу ефірних олій з поверхнево-активними речовинами *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованими за наявності еукаріотичного індуктора

Результати показали, що комплекс ефірної олії чайного дерева і ПАР, синтезованих за наявності індукторів ефективніше руйнували бактеріальні та дріжджові комбіновані біоплівки, ніж відповідні монопрепарати, а також комплекс олії з ПАР, синтезованих без індуктора (табл. 6.6-6.8). Так, внесення у середовище культивування живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 супроводжувалось синтезом ПАР, які у комплексі з ефірною олією чайного дерева у широкому діапазоні концентрацій (2,02-130 мкг/мл) ефективніше на 4-18 та 7-24 % руйнували комбіновану біоплівку *S. aureus* БМС-1 та *E. coli* ІЕМ-1 порівняно з монопрепаратом олії та сумішню олії і ПАР, одержаних без індуктора. Схожі закономірності спостерігались за дії на дану біоплівку комплексу олії з ПАР, одержаних за наявності у середовищі культивування штаму ІМВ В-7405 супернатанту. При цьому ступінь руйнування зріс на 4-12 та 4-21% порівняно з дією тільки ефірної олії та суміші олії і ПАР, синтезованих без індуктора (табл. 6.6).

Таблиця 6.6

Деструкція комбінованої біоплівки *S. aureus* БМС-1 та *E. coli* ІЕМ-1 за дії ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за наявності уекаріотичного індуктора, ЕО чайного дерева та їх суміші

Антимікробна сполука	Наявність індуктора у середовищі культивування продуцента ПАР	Деструкція біоплівки (%) за дії антимікробних сполук концентрацією (мкг/мл)						
		130	65	32,5	16,2	8,1	4,05	2,02
ЕО чайного дерева	-	69	55	54	51	47	43	37
ПАР	живі клітини	23	17	34	24	31	47	30
	супернатант	56	53	46	45	47	40	38
	інактивовані клітини	52	45	38	37	35	21	23
	контроль (без індуктора)	55	50	50	47	43	37	32
суміш ПАР та ефірної олії чайного дерева	живі клітини	81	71	63	57	53	47	41
	супернатант	75	65	62	57	59	47	46
	інактивовані клітини	57	47	41	40	43	43	39
	контроль (без індуктора)	68	61	50	39	39	26	26

Примітка: табл. 6.6–6.8 як джерело вуглецю для культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка); під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %.

Так, внесення у середовище культивування живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 супроводжувалось синтезом ПАР, які у комплексі з ефірною олією чайного дерева у широкому діапазоні концентрацій (2,02-130 мкг/мл) ефективніше на 4-18 та 7-24 % руйнували комбіновану біоплівку *E. coli* ІЕМ-1 та *S. aureus* БМС-1 порівняно з монопрепаратом олії та сумішшю олії і ПАР, одержаних без індуктора. Схожі закономірності спостерігались за дії на дану біоплівку комплексу олії з ПАР, одержаних за наявності у середовищі культивування штаму ІМВ В-7405 супернатанту. При цьому ступінь руйнування зріс на 4-12 та 4-21% порівняно з дією тільки ефірної олії та суміші олії і ПАР, синтезованих без індуктора (табл. 6.6).

Порівняно з дією монопрепаратів поверхнево-активних речовин, обробка сумішшю їх з ефірною олією дозволила підвищити ступінь деструкції двовидової біоплівки *C. albicans* Д-6 та *Pseudomonas* sp. ІМ-2 до 56% у разі використання ПАР, синтезованих за присутності живих клітин індуктора, до 47% у разі внесення інактивованих та до 57% у разі внесення супернатанту (табл. 6.7).

Аналогічні закономірності спостерігали за дії на біоплівку *C. utilis* БВС-65 та *E. coli* ІЕМ-1 суміші олії чайного дерева та ПАР, одержаних за наявності у середовищі культивування продуцента еукаріотичних клітин (табл 6.8). При цьому ступінь руйнування такої біоплівки у разі використання суміші ефірної олії та ПАР, одержаних за наявності як живих клітин, так і супернатанту у всьому дослідженому діапазоні концентрацій (2,02-130 мкг/мл) майже не відрізнявся і становив 35-100% і був вищим ніж у разі використання ПАР, одержаних на середовищі без індуктора (13-39) та ефірної олії (30-73)

Руйнування двовидової біоплівки *C. albicans* Д-6 та *Pseudomonas* sp. ІМ-2 за дії ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1, ефірної олії чайного дерева та їх суміші

Антимікробна сполука	Індуктор у середовищі культивування продуцента ПАР	Деструкція біоплівки (%) за дії антимікробних сполук концентрацією (мкг/мл)						
		130	65	32,5	16,2	8,1	4,05	2,02
ефірна олія чайного дерева	-	63	64	57	56	47	46	38
ПАР	живі клітини	50	29	26	21	21	16	17
	супернатант	54	41	36	34	30	33	28
	інактивовані клітини	39	38	37	33	23	26	15
	контроль (без індуктора)	32	34	26	33	24	26	19
суміш ПАР та ефірної олії чайного дерева	живі клітини	99	94	89	68	57	43	43
	супернатант	100	85	79	68	50	43	48
	інактивовані клітини	70	60	61	55	49	41	35
	контроль (без індуктора)	43	40	34	36	33	28	33

Руйнування комбінованої біоплівки *C. utilis* БВС-65 та *E. coli* ІЕМ-1 під впливом комплексу ефірної олії ПАР, і відповідних монопрепаратів біоцидів

Антимікробна сполука	Індуктор у середовищі культивування продуцента ПАР	Деструкція біоплівки (%) за дії антимікробних сполук концентрацією (мкг/мл)						
		130	65	32,5	16,2	8,1	4,05	2,02
ефірна олія чайного дерева	-	73	60	53	53	52	42	30
ПАР	живі клітини	54	44	42	33	27	23	15
	супернатант	65	55	48	43	43	39	32
	інактивовані клітини	44	42	33	32	33	25	20
	контроль (без індуктора)	39	30	25	25	29	18	13
суміш ПАР та ефірної олії чайного дерева	живі клітини	100	80	69	52	47	48	35
	супернатант	95	81	72	73	50	41	38
	інактивовані клітини	58	67	58	47	47	43	33
	контроль (без індуктора)	65	60	51	40	38	36	24

У доступній літературі не вдалося знайти інформацію щодо деструкції двовидових біоплівки за дії комплексу ЕО та мікробних вторинними метаболітів, синтезованих за наявності біологічних індукторів. Наявні лише дані деструкції таких біоплівок під дією суміші ефірних олій антибіотиків (Budzyńska et al., 2017; Maione et al., 2022).

У роботі (Budzyńska et al., 2017) було показано синергічну дію ефірної олії гвоздики та антибіотиків мупіроцину, флуконазолу у руйнуванні двовидової бактеріально-дріжджової біоплівки *C. auris/S. aureus*. Так, у разі використання комплексу ЕО гвоздики як з мупіроцином так і флуконазолом ступінь друйнування становив 58,6 та 61,11 % відповідно, і був у 4 та 10 рази вищим, ніж за використання лише антибіотиків.

Maione та ін. показали синергічний ефект використання антибіотика каспофунгіну, меропенему у комбінації з міртенолом – основним компонентом ефірної олії мирту у руйнуванні біоплівки *C. auris* та *Klebsiella pneumoniae*. При цьому ступінь руйнування біоплівки за дії такої суміші становив 80 та 72% і був вищим ніж у разі використання лише меропенему або каспофунгіну відповідно (Maione et al., 2022).

Отже, отримані результати підтверджують синергізм дії ефірної олії чайного дерева поверхнево-активними речовинами, синтезованими *R. erythropolis* IMB Ac-5017 та *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за присутності у середовищі культивування живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, у боротьбі з двовидовими біоплівками.

Висновки до розділу 6

Внесення дріжджового індуктора у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 посилює антифунгальну та антибактеріальну активність синтезованих ПАР. Одержані поверхнево-активні речовини, синтезовані за наявності еукаріотичного індуктора у суміші з ефірною олією чайного дерева руйнують двовидові (бактерія-бактерія та бактерія-дріжджі) біоплівки.

Одержані дані щодо вищої ефективності ПАР, одержаних за наявності живих клітин індуктора та супернатанту щодо досліджуваних тест-культур порівняно з інактивованими клітинами можуть свідчити про те, що індукція потребує як хімічної, так і біологічної взаємодії між продуцентом ПАР та індуктором. Ймовірно, що під час автоклавування відбувається денатурація білків та інших макромолекул клітин індуктора, що частково пригнічує потенційні біохімічні взаємодії.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що незалежно від умов культивування (типу субстрату, наявності у середовищі конкурентних мікроорганізмів), синтезовані *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 поверхнево-активні речовини проявляють синергізм біологічної активності з різними біоцидами.

2. Поверхнево-активні речовини, утворені *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 в різних умовах культивування, проявляли синергічну антимікробну активність з офлоксацином та ципрофлоксацином та ефірною олією чайного дерева. Мінімальні інгібуючі концентрації суміші ПАР з антибіотиками щодо *Pseudomonas* sp МІ-2, *E.coli* ІЕМ-1, *S. aureus* БМС-1 становили 0,8-25,5 мкг/мл і були значно нижчими, ніж кожної сполуки окремо (500-2500 і 3,2-102,5 мкг/мл для антибіотиків та ПАР відповідно). Використання суміші поверхнево-активних речовин та ефірної олії дало змогу знизити МІК останньої щодо досліджуваних бактерій з 156-625 до 2,4-19,5 мкг/мл.

3. Незалежно від умов культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезовані ПАР проявляли синергізм антифунгальної дії у суміші з клотримазолом, флуконазолом та знижували МІК антифунгальних препаратів щодо *C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2 та *C. utilis* БМС-65 у 4-32 рази. Використання суміші ефірних олій кориці та лемонграсу з ПАР, синтезованими в різних умовах культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, дало змогу знизити МІК ефірних олій щодо досліджуваних дріждів роду *Candida* у 4-18 разів (з 156 до 8,5–39 мкг/мл), при цьому значення фракційної інгібуючої концентрації не перевищувало 0,5, що вказує на синергізм антифунгальної дії.

4. У разі використання суміші поверхнево-активних речовин, утворених *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезованих як на традиційних (етанол) та і просмислових відходах (пересмажена олія) з антибіотиками чи ефірною олією чайного дерева адгезія *Pseudomonas* sp МІ-2, *E. cloacae* С-8 і *P.vulgaris* РА-12 до кахелю та сталі була у 2-2,1 та 2,6-3,1 рази нижчою, ніж після обробки монопрепаратами ПАР, антибіотиків чи ефірної олії.

5. Ступінь деструкції бактеріальних *P. sp* МІ-2, *E. cloacae* С-8 і *P. vulgaris* РА-12 та дріжджових *C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2 та *C. utilis* БМС-65 біоплівки за дії ПАР, синтезованих штамами ІМВ Ас-5017 та ІМВ В-7241 в різних умовах культивування, у суміші з ефірними оліями, антибіотиками чи антифунгальними препаратами, був 1,9-2,7 та 1,3-3,5 разів вищим порівняно з встановленим для монопрепаратів ПАР, антибіотиків, антифунгальних речовин чи ефірних олій.

6. У разі використання суміші антибіотиків ефірної олії чайного дерева з ПАР, синтезованими за внесення живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовище культивування штамів ІМВ В-7241 та ІМВ Ас-5017 спостерігали зниження МІК щодо бактеріальних та дріжджових тест-культур поверхнево-активних речовин та ефірної олії у 2,0–40 та 15–960 разів відповідно.

7. Деструкція двовидових бактеріально-бактеріальних (*S. aureus* БМС-1 та *E. coli* ІЕМ-1; *S. aureus* БМС-1 та *B. subtilis* БТ-2; *P. vulgaris* РА-12 та *E. cloacae* С-8) і бактеріально-дріжджових (*C. utilis* БВС-65 та *E. coli* ІЕМ-1; *C. albicans* Д-6 та *Pseudomonas sp.* ІМ-2; *C. albicans* Д-6 та *B. subtilis* БТ-2) біоплівок за дії комплексу ефірної олії чайного дерева з ПАР штамів ІМВ В-7241 та ІМВ Ас-5017, синтезованих за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1 була в 1,3–1,8 та 1,2-2,9 разів вищою порівняно із використанням монопрепаратів ПАР чи ефірної олії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Aghayan, S. S., Kalalian Mogadam, H., Fazli, M., Darban-Sarokhalil, D., Khoramrooz, S. S., Jabalameli, F., Yaslianifard, S., & Mirzaii, M. (2017). The effects of berberine and palmatine on efflux pumps inhibition with different gene patterns in *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn infections. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 9(1), 2–7.
- Aghraz, A., Benameur, Q., Gervasi, T., Ait Dra, L., Ben-Mahdi, M. H., Larhsini, M., Markouk, M., & Cicero, N. (2018). Antibacterial activity of *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* essential oils alone and in combination with conventional antibiotics against *Enterobacteriaceae* isolates. *Letters in applied microbiology*, 67(2), 175–182. <https://doi.org/10.1111/lam.13007>
- Alharthi, S. S., Badr, A. N., Gromadzka, K., Stuper-Szablewska, K., Abdel-Razek, A. G., & Selim, K. (2021). Bioactive molecules of mandarin seed oils diminish mycotoxin and the existence of fungi. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(23), 7130. <https://doi.org/10.3390/molecules26237130>
- Allegrone, G., Ceresa, C., Rinaldi, M., & Fracchia, L. (2021). Diverse Effects of natural and synthetic surfactants on the inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Pharmaceutics*, 13(8),1172. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081172>
- Alves, A. R., Sequeira, A. M., & Cunha, Â. (2019). Increase in bacterial biosurfactant production by co-cultivation with biofilm-forming bacteria. *Letters in applied microbiology*, 69(1), 79–86. <https://doi.org/10.1111/lam.13169>
- Araújo Silva, V., Pereira da Sousa, J., de Luna Freire Pessôa, H., Fernanda Ramos de Freitas, A., Douglas Melo Coutinho, H., Beuttenmuller Nogueira Alves, L., & Oliveira Lima, E. (2016). *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Pharmaceutical biology*, 54(5), 863–867. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1088551>
- Ardi, M. S., Aroua, M. K., & Hashim, N. A. (2015). Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renew. Sustainable Energy*, 42, 1164-1173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.091>

- Asadi, A., Razavi, S., Talebi, M., & Gholami, M. (2019). A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection*, *47*(1), 13–23. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1222-5>
- Asadi, S., Nayeri-Fasaei, B., Zahraei-Salehi, T., Yahya-Rayat, R., Shams, N., & Sharifi, A. (2023). Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against *Escherichia coli*. *BMC microbiology*, *23*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02797-x>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, *11*, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Bag, A., & Chattopadhyay, R. R. (2014). Efflux-pump inhibitory activity of a gallotannin from *Terminalia chebula* fruit against multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Natural product research*, *28*(16), 1280–1283. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.895729>
- Bai, S., Qiao, B., Hou, Z. J., Gao, G. R., Cao, C. Y., Cheng, J. S., & Yuan, Y. J. (2023). Mutualistic microbial community of *Bacillus amyloliquefaciens* and recombinant *Yarrowia lipolytica* co-produced lipopeptides and fatty acids from food waste. *Chemosphere*, *310*, 136864. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136864>
- Bano, S., Hassan, N., Rafiq, M., Hassan, F., Rehman, M., Iqbal, N., Ali, H., Hasan, F., & Kang, Y. Q. (2023). Biofilms as battlefield armor for bacteria against antibiotics: challenges and combating strategies. *Microorganisms*, *11*(10), 2595. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102595>
- Bhatnagar, K., & Wong, A. (2019). The mutational landscape of quinolone resistance in *Escherichia coli*. *PloS one*, *14* (11), e0224650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224650>
- Bhattacharya, D., Ghosh, D., Bhattacharya, S., Sarkar, S., Karmakar, P., Koley, H., & Gachhui, R. (2018). Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha

- against *Vibrio cholerae*: targeting cell membrane. *Letters in applied microbiology*, 66(2), 145–152. <https://doi.org/10.1111/lam.12829>
- Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B. C. (2020). Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(6), 312. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Brejijeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Brożyna, M., Paleczny, J., Kozłowska, W., Chodaczek, G., Dudek-Wicher, R., Felińczak, A., Gołębiowska, J., Górniak, A., & Junka, A. (2021). The antimicrobial and antibiofilm in vitro activity of liquid and vapour phases of selected essential oils against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1207. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091207>
- Budzyńska, A., Różalska, S., Sadowska, B., & Różalska, B. (2017). *Candida albicans*/*Staphylococcus aureus* dual-species biofilm as a target for the combination of essential oils and fluconazole or mupirocin. *Mycopathologia*, 182(11-12), 989–995. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0192-y>.
- Buldain, D., Buchamer, A. V., Marchetti, M. L., Aliverti, F., Bandoni, A., & Mestorino, N. (2018). Combination of cloxacillin and essential oil of *Melaleuca armillaris* as an alternative against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in veterinary science*, 5, 177. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00177>
- Carbone, C., Teixeira, M. D. C., Sousa, M. D. C., Martins-Gomes, C., Silva, A. M., Souto, E. M. B., & Musumeci, T. (2019). Clotrimazole-loaded mediterranean essential oils nlc: a synergic treatment of *Candida* skin infections. *Pharmaceutics*, 11(5), 231. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050231>

- Caudal, F., Tapissier-Bontemps, N., & Edrada-Ebel, R. A. (2022). Impact of co-culture on the metabolism of marine microorganisms. *Marine drugs*, 20(2), 153. <https://doi.org/10.3390/md20020153>
- Ceresa, C., Rinaldi, M., Tessarolo, F., Maniglio, D., Fedeli, E., Tambone, E., Caciagli, P., Banat, I. M., Diaz De Rienzo, M. A., & Fracchia, L. (2021). Inhibitory effects of lipopeptides and glycolipids on *C. albicans-Staphylococcus* spp. Dual-species biofilms. *Frontiers in microbiology*, 11, 545654. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.545654>
- Chatzifragkou, A., & Papanikolaou, S. (2012). Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(1), 13–27. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4111-3>
- Cheesman, M. J., Ilanko, A., Blonk, B., & Cock, I. E. (2017). Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?. *Pharmacognosy reviews*, 11(22), 57–72. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_21_17
- Chen, X. Y., Sun, H. Z., Qiao, B., Miao, C. H., Hou, Z. J., Xu, S. J., Xu, Q. M., & Cheng, J. S. (2022). Improved the lipopeptide production of *Bacillus amyloliquefaciens* HM618 under co-culture with the recombinant *Corynebacterium glutamicum* producing high-level proline. *Bioresource technology*, 349, 126863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126863>
- Chen, X., Li, P., Shen, Y., Zou, Y., Yuan, G., & Hu, H. (2019). Rhamnolipid-involved antibiotics combinations improve the eradication of *Helicobacter pylori* biofilm in vitro: a comparison with conventional triple therapy. *Microbial pathogenesis*, 131, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.001>
- Chevrette, M. G., Thomas, C. S., Hurley, A., Rosario-Meléndez, N., Sankaran, K., Tu, Y., Hall, A., Magesh, S., & Handelsman, J. (2022). Microbiome composition modulates secondary metabolism in a multispecies bacterial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(42), e2212930119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212930119>

- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Ciurko, D., Czyżnikowska, Ż., Kancelista, A., Łaba, W., & Janek, T. (2022). Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>
- Coimbra, A., Miguel, S., Ribeiro, M., Coutinho, P., Silva, L., Duarte, A. P., & Ferreira, S. (2022). *Thymus zygis* essential oil: phytochemical characterization, bioactivity evaluation and synergistic effect with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(2), 146. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020146>
- Cui, J., Ren, B., Tong, Y., Dai, H., & Zhang, L. (2015). Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*, 6(4), 362–371. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1039885>
- da Nóbrega Alves, D., Monteiro, A. F. M., Andrade, P. N., Lazarini, J. G., Abílio, G. M. F., Guerra, F. Q. S., Scotti, M. T., Scotti, L., Rosalen, P. L., & Castro, R. D. (2020). Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of Cinnamaldehyde. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 5969. <https://doi.org/10.3390/molecules25245969>
- Das, S., Horváth, B., Šafranko, S., Jokić, S., Széchenyi, A., & Kőszegi, T. (2019). Antimicrobial activity of chamomile essential oil: effect of different formulations. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23), 4321. <https://doi.org/10.3390/molecules24234321>
- Di Vito, M., Garzoli, S., Rosato, R., Mariotti, M., Gervasoni, J., Santucci, L., Ovidi, E., Cacaci, M., Lombarini, G., Torelli, R., Urbani, A., Sanguinetti, M., & Bugli, F. (2023). A new potential resource in the fight against *Candida auris*: the *Cinnamomum zeylanicum* essential oil in synergy with antifungal

<https://doi.org/10.1128/spectrum.04385-22>

- Dong, G., Li, J., Chen, L., Bi, W., Zhang, X., Liu, H., Zhi, X., Zhou, T., & Cao, J. (2019). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli*. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 23(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.01.004>
- Duarte, A., Ferreira, S., Silva, F., & Domingues, F. C. (2012). Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 19(3-4), 236–238. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.11.010>
- Dwivedi, G. R., Tyagi, R., Sanchita, Tripathi, S., Pati, S., Srivastava, S. K., Darokar, M. P., & Sharma, A. (2018). Antibiotics potentiating potential of catharanthine against superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 36(16), 4270–4284. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1413424>
- El Atki, Y., Aouam, I., El Kamari, F., Taroq, A., Nayme, K., Timinouni, M., Lyoussi, B., & Abdellaoui, A. (2019). Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 10(2), 63–67. https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_366_18
- El-Baz, A. M., Mosbah, R. A., Goda, R. M., Mansour, B., Sultana, T., Dahms, T. E. S., & El-Ganiny, A. M. (2021). Back to nature: combating *Candida albicans* biofilm, phospholipase and hemolysin using plant essential oils. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(1), 81. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010081>
- Elshikh, M., Funston, S., Chebbi, A., Ahmed, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2017). Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. *New biotechnology*, 36, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.009>
- Esteves, D. C., Pereira, V. C., Souza, J. M., Keller, R., Simões, R. D., Winkelstroter Eller, L. K., & Rodrigues, M. V. (2016). Influence of biological fluids in bacterial

- viability on different hospital surfaces and fomites. *American journal of infection control*, 44(3), 311–314. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.09.033>
- Fifani, B., Steels, S., Helmus, C., Delacuvellerie, A., Deracinois, B., Phalip, V., ... & Jacques, P. (2022). Coculture of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus velezensis* based on metabolic cross-feeding modulates lipopeptide production. *Microorganisms*, 10(5), 1059. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051059>
- Founou, R. C., Founou, L. L., & Essack, S. Y. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>
- Francisconi, R. S., Huacho, P. M. M., Tonon, C. C., Bordini, E. A. F., Correia, M. F., Sardi, J. C. O., & Spolidorio, D. M. P. (2020). Antibiofilm efficacy of tea tree oil and of its main component terpinen-4-ol against *Candida albicans*. *Brazilian oral research*, 34, e050. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0050>
- Gadenne, V., Lebrun, L., Jouenne, T., & Thebault, P. (2013). Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 112, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.061>
- Galdiero, E., Ricciardelli, A., D'Angelo, C., de Alteriis, E., Maione, A., Albarano, L., Casillo, A., Corsaro, M. M., Tutino, M. L., & Parrilli, E. (2021). Pentadecanoic acid against *Candida albicans*-*Klebsiella pneumoniae* biofilm: towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections. *Research in microbiology*, 172(7-8), 103880. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103880>
- Gaspar de Toledo, L., Dos Santos Ramos, M. A., Bento da Silva, P., Rodero, C. F., de Sá Gomes, V., Noronha da Silva, A., Pavan, F. R., da Silva, I. C., Bombarda Oda, F., Flumignan, D. L., Gonzaga Dos Santos, A., Chorilli, M., Gottardo de Almeida, M. T., & Bauab, T. M. (2020). Improved *in vitro* and *in vivo* Anti-*Candida albicans* Activity of *Cymbopogon nardus* essential oil by its incorporation into a microemulsion system. *International journal of nanomedicine*, 15, 10481–10497. <https://doi.org/10.2147/IJN.S275258>

- Giddins, M. J., Macesic, N., Annavajhala, M. K., Stump, S., Khan, S., McConville, T. H., Mehta, M., Gomez-Simmonds, A., & Uhlemann, A. C. (2018). Successive emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in bla_{KPC-2}-harboring *Klebsiella pneumoniae* sequence type 307 isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(3), e02101-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02101-17>
- Giri, S. S., Ryu, E. C., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2019). Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. *Microbial pathogenesis*, 132, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.035>
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., & de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology*, 863. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00863>
- Grădinaru, A. C., Trifan, A., Șpac, A., Brebu, M., Miron, A., & Aprotosoai, A. C. (2018). Antibacterial activity of traditional spices against lower respiratory tract pathogens: combinatorial effects of *Trachyspermum ammi* essential oil with conventional antibiotics. *Letters in applied microbiology*, 67(5), 449–457. <https://doi.org/10.1111/lam.13069>
- Guégan, C., Garderes, J., Le Pennec, G., Gaillard, F., Fay, F., Linossier, I., Herry, J. M., Fontaine, M. N., & Réhel, K. V. (2014). Alteration of bacterial adhesion induced by the substrate stiffness. *Colloids and surfaces: B, Biointerfaces*, 114, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.010>
- Guilbaud, M., Bruzard, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A., Monnet, V., Herry, J. M., Chevalier, S., & Bellon-Fontaine, M. N. (2017). Proteomic response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhering to solid surfaces. *Frontiers in microbiology*, 8, 1465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01465>

- Gurung, R. R., Maharjan, P., & Chhetri, G. G. (2020). Antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* with reference to MRSA isolates from pediatric patients. *Future science OA*, 6(4), FSO464. <https://doi.org/10.2144/foa-2019-0122>
- Haba, E., Bouhdid, S., Torrego-Solana, N., Marqués, A. M., Espuny, M. J., García-Celma, M. J., & Manresa, A. (2014). Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of pharmaceutics*, 476(1-2), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.039>
- Hamza, F., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. (2018). Coculture induced improved production of biosurfactant by *Staphylococcus lentus* SZ2: Role in protecting *Artemia salina* against *Vibrio harveyi*. *Enzyme and microbial technology*, 114, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.03.008>
- Haq, A., Siddiqi, M., Batool, S. Z., Islam, A., Khan, A., Khan, D., Khan, S., Khan, H., Shah, A. A., Hasan, F., Ahmed, S., & Badshah, M. (2019). Comprehensive investigation on the synergistic antibacterial activities of *Jatropha curcas* pressed cake and seed oil in combination with antibiotics. *AMB Express*, 9(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0793-6>
- Herman, A., & Herman, A.P. (2021). Herbal products and their active constituents used alone and in combination with antifungal drugs against drug-resistant *Candida* sp. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(6), 655. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060655>
- Hosseini, S. S., Joshaghani, H., Shokohi, T., Ahmadi, A., & Mehrbakhsh, Z. (2020). Antifungal activity of zno nanoparticles and nystatin and downregulation of SAP1-3 genes expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidiasis. *Infection and drug resistance*, 13, 385–394. <https://doi.org/10.2147/IDR.S226154>
- Iguchi, S., Mizutani, T., Hiramatsu, K., & Kikuchi, K. (2016). Rapid acquisition of linezolid resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of hypermutation and homologous recombination. *PloS one*, 11(5), e0155512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155512>

- Iseppi, R., Condò, C., & Messi, P. (2023). Synergistic inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by *Melaleuca alternifolia* chell (tea tree) and *Eucalyptus globulus* labill. Essential oils in association with oxacillin. *Antibiotics*, 12(5), 846. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050846>
- Iseppi, R., Mariani, M., Benvenuti, S., Truzzi, E., & Messi, P. (2023). Effects of *Melaleuca alternifolia* Chell (tea tree) and *Eucalyptus globulus* labill. Essential oils on antibiotic-resistant bacterial biofilms. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(4), 1671. <https://doi.org/10.3390/molecules28041671>
- Jabłońska-Trypuć, A., Makuła, M., Włodarczyk-Makuła, M., Wołejko, E., Wydro, U., Serra-Majem, L., & Wiater, J. (2022). Inanimate surfaces as a source of hospital infections caused by fungi, bacteria and viruses with particular emphasis on SARS-CoV-2. *International journal of environmental research and public health*, 19(13), 8121. <https://doi.org/10.3390/ijerph19138121>
- Jafri, H., & Ahmad, I. (2020). *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de mycologie medicale*, 30(1), 100911. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100911>
- Jahangiri, A., Neshani, A., Mirhosseini, S. A., Ghazvini, K., Zare, H., & Sedighian, H. (2021). Synergistic effect of two antimicrobial peptides, nisin and P10 with conventional antibiotics against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbial pathogenesis*, 150, 104700. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104700>
- Jean, S. S., Harnod, D., & Hsueh, P. R. (2022). Global threat of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 823684. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.823684>
- Joshi-Navare, K., & Prabhune, A. (2013). A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *BioMed research international*, 512495. <https://doi.org/10.1155/2013/512495>
- Joung, D. K., Choi, S. H., Kang, O. H., Kim, S. B., Mun, S. H., Seo, Y. S., Kang, D. H., Gong, R., Shin, D. W., Kim, Y. C., & Kwon, D. Y. (2015). Synergistic effects of

- oxyresveratrol in conjunction with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular medicine reports*, 12(1), 663–667. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3345>
- Joung, D. K., Joung, H., Yang, D. W., Kwon, D. Y., Choi, J. G., Woo, S., Shin, D. Y., Kweon, O. H., Kweon, K. T., & Shin, D. W. (2012). Synergistic effect of rhein in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Experimental and therapeutic medicine*, 3(4), 608–612. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.459>
- Joung, D. K., Kang, O. H., Seo, Y. S., Zhou, T., Lee, Y. S., Han, S. H., Mun, S. H., Kong, R., Song, H. J., Shin, D. W., & Kwon, D. Y. (2016). Luteolin potentiates the effects of aminoglycoside and β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, 11(6), 2597–2601. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3212>
- Kakarla, P., Floyd, J., Mukherjee, M., Devireddy, A. R., Inupakutika, M. A., Ranweera, I., Kc, R., 'Shrestha, U., Cheeti, U. R., Willmon, T. M., Adams, J., Bruns, M., Gunda, S. K., & Varela, M. F. (2017). Inhibition of the multidrug efflux pump LmrS from *Staphylococcus aureus* by cumin spice *Cuminum cyminum*. *Archives of microbiology*, 199(3), 465–474. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1314-5>
- Kampshoff, F., Willcox, M. D. P., & Dutta, D. (2019). A pilot study of the synergy between two antimicrobial peptides and two common antibiotics. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(2), 60. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020060>
- Kang, H. K., Kim, H. Y., & Cha, J. D. (2011). Synergistic effects between silibinin and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Biotechnology journal*, 6(11), 1397–1408. <https://doi.org/10.1002/biot.201000422>
- Kumar, S. N., Aravind, S. R., Sreelekha, T. T., Jacob, J., & Kumar, B. S. (2015). Asarones from *Acorus calamus* in combination with azoles and amphotericin B: a novel synergistic combination to compete against human pathogenic *Candida* species in vitro. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(8), 3683–3695. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1537-y>

- Kumar, S. N., Nambisan, B., Mohandas, C., & Sundaresan, A. (2013). *In vitro* synergistic activity of diketopiperazines alone and in combination with amphotericin B or clotrimazole against *Candida albicans*. *Folia microbiologica*, 58(6), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0234-x>
- Lahmar, A., Bedoui, A., Mokdad-Bzeouich, I., Dhaouifi, Z., Kalboussi, Z., Cheraif, I., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2017). Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microbial pathogenesis*, 106, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.018>
- Lavigne, J. P., Ranfaing, J., Dunyach-Rémy, C., & Sotto, A. (2020). Synergistic effect of propolis and antibiotics on uropathogenic *Escherichia coli*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(11), 739. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110739>
- Lee, Y. S., Kang, O. H., Choi, J. G., Oh, Y. C., Keum, J. H., Kim, S. B., Jeong, G. S., Kim, Y. C., Shin, D. W., & Kwon, D. Y. (2010). Synergistic effect of emodin in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical biology*, 48(11), 1285–1290. <https://doi.org/10.3109/13880201003770150>
- Li, Z., Yin, H., Chen, W., Jiang, C., Hu, J., Xue, Y., Yao, D., Peng, Y., & Hu, X. (2020). Synergistic effect of pseudolaric acid b with fluconazole against resistant isolates and biofilm of *Candida tropicalis*. *Infection and drug resistance*, 13, 2733–2743. <https://doi.org/10.2147/IDR.S261299>
- Lin, Z., Wang, G., Li, S., Zhou, L., & Yang, H. (2022). Dual-species biofilms formed by *Escherichia coli* and *Salmonella* enhance chlorine tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(22), e01482-22. <https://doi.org/10.1128/aem.01482-22>
- Liu, J., Chen, F., Wang, X., Peng, H., Zhang, H., & Wang, K. J. (2020). The synergistic effect of mud crab antimicrobial peptides sphistin and SPH₁₂₋₃₈ with antibiotics azithromycin and rifampicin enhances bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 572849. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572849>

- Liu, T., Wang, J., Gong, X., Wu, X., Liu, L., & Chi, F. (2020). Rosemary and tea tree essential oils exert antibiofilm activities *in vitro* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of food protection*, 83(7), 1261–1267. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-337>
- Luti, K. J., Yonis, R. W., & Mahmoud, S. T. (2018). An application of solid state fermentation and elicitation with some microbial cells for the enhancement of prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Al-Nahrain Journal of Science*, 21(2), 98-105. <https://doi.org/10.22401/JNUS.21.2.15>
- Maheshwari, M., Safar Althubiani, A., Hasan Abulreesh, H., Abul Qais, F., Shavez Khan, M., & Ahmad, I. (2019). Bioactive extracts of *Carum copticum* L. enhances efficacy of ciprofloxacin against MDR enteric bacteria. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), 1848–1855. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.12.008>
- Maione, A., La Pietra, A., de Alteriis, E., Mileo, A., De Falco, M., Guida, M., & Galdiero, E. (2022). Effect of myrtenol and its synergistic interactions with antimicrobial drugs in the inhibition of single and mixed biofilms of *Candida auris* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms*, 10(9), 1773. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091773>.
- Malik, T., Singh, P., Pant, S., Chauhan, N., & Lohani, H. (2011). Potentiation of antimicrobial activity of ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* essential oil against selected uropathogens. *Phytotherapy research: PTR*, 25(8), 1225–1228. <https://doi.org/10.1002/ptr.3479>
- Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B., & Proksch, P. (2014). Co-cultivation--a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine drugs*, 12(2), 1043–1065. <https://doi.org/10.3390/md12021043>
- Melo, R. S., Albuquerque Azevedo, Á. M., Gomes Pereira, A. M., Rocha, R. R., Bastos Cavalcante, R. M., Carneiro Matos, M. N., Ribeiro Lopes, P. H., Gomes, G. A., Soares Rodrigues, T. H., Santos, H. S. D., Ponte, I. L., Costa, R. A., Brito, G. S., Catunda Júnior, F. E. A., & Carneiro, V. A. (2019). Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. essential oil against

- multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(21), 3864. <https://doi.org/10.3390/molecules24213864>
- Miranda-Cadena, K., Marcos-Arias, C., Mateo, E., Aguirre-Urizar, J. M., Quindós, G., & Eraso, E. (2021). *In vitro* activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 143, 112218. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112218>
- Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8088. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>
- Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8088. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>
- Mohamed, S. H., Mohamed, M. S. M., Khalil, M. S., Azmy, M., & Mabrouk, M. I. (2018). Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of applied microbiology*, 125(1), 84–95. <https://doi.org/10.1111/jam.13755>
- Moreira, P., Matos, P., Figueirinha, A., Salgueiro, L., Batista, M. T., Branco, P. C., Cruz, M. T., & Pereira, C. F. (2022). Forest biomass as a promising source of bioactive essential oil and phenolic compounds for alzheimer's disease therapy. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8812. <https://doi.org/10.3390/ijms23158812>
- Mun, S. H., Joung, D. K., Kim, Y. S., Kang, O. H., Kim, S. B., Seo, Y. S., Kim, Y. C., Lee, D. S., Shin, D. W., Kweon, K. T., & Kwon, D. Y. (2013). Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 20(8-9), 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.006>

- Mun, S. H., Lee, Y. S., Han, S. H., Lee, S. W., Cha, S. W., Kim, S. B., Seo, Y. S., Kong, R., Kang, D. H., Shin, D. W., Kang, O. H., & Kwon, D. Y. (2015). *In vitro* potential effect of morin in the combination with β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Foodborne pathogens and disease*, *12*(6), 545–550. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1923>
- Murugaiyan, J., Kumar, P. A., Rao, G. S., Iskandar, K., Hawser, S., Hays, J. P., Mohsen, Y., Adukkadukkam, S., Awuah, W. A., Jose, R. A. M., Sylvia, N., Nansubuga, E. P., Tilocca, B., Roncada, P., Roson-Calero, N., Moreno-Morales, J., Amin, R., Kumar, B. K., Kumar, A., Toufik, A. R., ... van Dongen, M. B. M. (2022). Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: focus on antibiotics. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *11*(2), 200. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020200>
- Naylor, N. R., Atun, R., Zhu, N., Kulasabanathan, K., Silva, S., Chatterjee, A., Knight, G. M., & Robotham, J. V. (2018). Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. *Antimicrobial resistance and infection control*, *7*, 58. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0336-y>
- Nazareth, T. C., Zanutto, C. P., Tripathi, L., Juma, A., Maass, D., de Souza, A. A. U., de Arruda Guelli Ulson de Souza, S. M., & Banat, I. M. (2020). The use of low-cost brewery waste product for the production of surfactin as a natural microbial biocide. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, *28*, e00537. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00537>
- Ohadi, M., Forootanfar, H., Dehghan-Noudeh, G., Eslaminejad, T., Ameri, A., Shakibaie, M., & Adeli-Sardou, M. (2019). Antimicrobial, anti-biofilm, and anti-proliferative activities of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. *Microbial Pathogenesis*, 103806. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103806>
- Oliveira, G. D., Rocha, W. R. V. D., Rodrigues, J. F. B., & Alves, H. D. S. (2022). Synergistic and antibiofilm effects of the essential oil from *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 16(1), 55.

<https://doi.org/10.3390/ph16010055>

Omar, A., Wright, J. B., Schultz, G., Burrell, R., & Nadworny, P. (2017). Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*, 5(1), 9.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>

Owen, L., & Laird, K. (2018). Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. *Critical reviews in microbiology*, 44(4), 414–435.

<https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1423616>

Pandurang, S., Devrao S., Ganpatrao R., & Mohan S. (2018). Lemongrass oil components synergistically activates fluconazole against biofilm forms of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 5(3): 1069.

Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62(4), e1–e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>

Parker, R. A., Gabriel, K. T., Graham, K. D., Butts, B. K., & Cornelison, C. T. (2022). Antifungal activity of select essential oils against *Candida auris* and their interactions with antifungal drugs. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(8), 821.

<https://doi.org/10.3390/pathogens11080821>

Patil, P.D., Gude, V.G., Reddy, H.K., Muppaneni, T., & Deng, S. (2012). Biodiesel production from waste cooking oil using sulfuric acid and microwave irradiation processes. *J. Environ. Protec*, 3, 107-113. <https://doi.org/10.4236/jep.2012.31013>

Pereira, F., Madureira, A. M., Sancha, S., Mulhovo, S., Luo, X., Duarte, A., & Ferreira, M. J. (2016). *Cleistochlamys kirkii* chemical constituents: antibacterial activity and synergistic effects against resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of ethnopharmacology*, 178, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.009>

- Pirog T. P., Kliuchka I. V., Kliuchka L. V. (2019). Synergistic action of essential oils with the biocides on microorganisms. *Biotechnologia Acta*, 12(4), 5-18, <https://doi.org/10.15407/biotech12.04.005>
- Pirog, T. P., Sidor, I.V., & Lutsai, D. A. (2016). Calcium and magnesium cations influence on antimicrobial and antiadhesive activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants. *Biotechnologia Acta*, 9(6), 50-57. <https://doi.org/10.15407/biotech9.06.050>
- Pirog, T., Sofilkanych, A., Shevchuk, T., & Shulyakova, M. (2013). Biosurfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017: synthesis intensification and practical application. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170, 880-894. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0246-7>
- Pirog, T.P. & Nikitiuk, L.V. (2017). Synergistic action of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants and antifungal agents. *Scientific Works of NUFT*, 23(1), 58-65. Ukrainian
- Pirog, T.P., Kliuchka, L.V., Kliuchka, I.V., Shevchuk, T.A., Iutynska, G.O. (2020). Synergism of antimicrobial and anti-adhesive activity of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants in a mixture with essential oils. *Microbiol. Z.*, 82(4), 31-40. <https://doi.org/10.15407/microbiolj82.04.031>
- Pirog, T.P., Lutsay, D.A., Shevchuk, T.A., & Iutynska, G.O. (2021). Synthesis and biological activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants depending on monovalent cations content in cultivation medium. *Microbiol. Zh.*, 83(2), 20–31. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.02.020>
- Pirog, T.P., Shevchuk, T.A., Voloshina, I.N., & Gregirchak N.N. (2005). Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil,. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 41(1), 51–55. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0010-z>
- Rahim, M. A., Ayub, H., Sehrish, A., Ambreen, S., Khan, F. A., Itrat, N., Nazir, A., Shoukat, A., Shoukat, A., Ejaz, A., Özogul, F., Bartkiene, E., & Rocha, J. M. (2023). Essential components from plant source oils: a review on extraction,

- detection, identification, and quantification. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(19), 6881. <https://doi.org/10.3390/molecules28196881>
- Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Mohammadi, P., Soudi, M. R., Babaie-Naiej, H., & Fallahi, H. (2014). A combination of cis-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. *Journal of medical microbiology*, 63(11), 1509–1516. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.075374-0>
- Ramchandran, R., Ramesh, S., Thakur, R., Chakrabarti, A., & Roy, U. (2020). Improved production of two anti-*Candida* lipopeptide homologues co-produced by the wild-type *Bacillus subtilis* RLID 12.1 under optimized conditions. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 21(5), 438-450. <https://doi.org/10.2174/1389201020666191205115008>
- Rasigade, J. P., Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., Laurent, F., & Dumitrescu, O. (2011). Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. *BMC microbiology*, 11, 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-263>
- Rishi, P., Vij, S., Maurya, I. K., Kaur, U. J., Bharati, S., & Tewari, R. (2018). Peptides as adjuvants for ampicillin and oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbial pathogenesis*, 124, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.023>
- Rivardo, F., Martinotti, M. G., Turner, R. J., & Ceri, H. (2011). Synergistic effect of lipopeptide biosurfactant with antibiotics against *Escherichia coli* CFT073 biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 37(4), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.12.011>
- Rosato, A., Carocci, A., Catalano, A., Clodoveo, M. L., Franchini, C., Corbo, F., Carbonara, G. G., Carrieri, A., & Fracchiolla, G. (2018). Elucidation of the synergistic action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. *PloS one*, 13(8), e0200902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200902>
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., & Antonietta Milillo, M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination

with Norfloxacin. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 14(11), 727–732.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.01.005>

Rossi, C. C., Santos-Gandelman, J. F., Barros, E. M., Alvarez, V. M., Laport, M. S., & Giambiagi-deMarval, M. (2016). *Staphylococcus haemolyticus* as a potential producer of biosurfactants with antimicrobial, anti-adhesive and synergistic properties. *Letters in applied microbiology*, 63(3), 215–221.

<https://doi.org/10.1111/lam.12611>

Rufino, R. D., Luna, J. M., Sarubbo, L. A., Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & Campos-Takaki, G. M. (2011). Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 84(1), 1–5.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.045>

Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature reviews. Microbiology*, 18(10), 571–586.

<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>

Saviuc, C.M., Drumea, V., Olariu, L., Chifiriuc, M.C., Bezirtzoglou, E., Lazăr, V. (2015). Essential oils with microbicidal and antibiofilm activity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 137–151.

Selegato, D. M., & Castro-Gamboa, I. (2023). Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation. *Frontiers in microbiology*, 14, 1117559.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1117559>

Selim, S. A., Adam, M. E., Hassan, S. M., & Albalawi, A. R. (2014). Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 179.

<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-179>

Shamim, A., Ali, A., Iqbal, Z., Mirza, M. A., Aqil, M., Kawish, S. M., Siddiqui, A., Kumar, V., Naseef, P. P., Alshadidi, A. A. F., & Saheer Kuruniyan, M. (2023). Natural Medicine a promising candidate in combating microbial biofilm. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(2), 299.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020299>

- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8, 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Singh, D. K., Tóth, R., & Gácsér, A. (2020). Mechanisms of pathogenic *Candida* species to evade the host complement attack. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 94. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00094>
- Singh, P., & Cameotra, S. S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in biotechnology*, 22(3), 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.01.010>
- Singh, V., & Phukan, U. J. (2019). Interaction of host and *Staphylococcus aureus* protease-system regulates virulence and pathogenicity. *Medical microbiology and immunology*, 208(5), 585–607. <https://doi.org/10.1007/s00430-018-0573-y>
- Siryaporn, A., Kuchma, S. L., O'Toole, G. A., & Gitai, Z. (2014). Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(47), 16860–16865. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415712111>
- Sommer, M. O. A., Munck, C., Toft-Kehler, R. V., & Andersson, D. I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm?. *Nature reviews. Microbiology*, 15(11), 689–696. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.75>
- Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). Effects of Material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *Journal of dental research*, 94(8), 1027–1034. <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>
- Song, M., Liu, Y., Huang, X., Ding, S., Wang, Y., Shen, J., & Zhu, K. (2020). A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant gram-negative pathogens. *Nature microbiology*, 5(8), 1040–1050. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0723-z>
- Souza, A. F., Rodriguez, D. M., Ribeaux, D. R., Luna, M. A., Lima E Silva, T. A., Andrade, R. F., Gusmão, N. B., & Campos-Takaki, G. M. (2016). Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel

- production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1608. <https://doi.org/10.3390/ijms17101608>
- Tabbene, O., Di Grazia, A., Azaiez, S., Ben Slimene, I., Elkahoui, S., Alfeddy, M. N., Casciaro, B., Luca, V., Limam, F., & Mangoni, M. L. (2015). Synergistic fungicidal activity of the lipopeptide bacillomycin D with amphotericin B against pathogenic *Candida* species. *FEMS yeast research*, 15(4), fov022. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov022>
- Talei, G. R., Mohammadi, M., Bahmani, M., & Kopaei, M. R. (2017). Synergistic effect of *Carum copticum* and *Mentha piperita* essential oils with ciprofloxacin, vancomycin, and gentamicin on gram-negative and gram-positive bacteria. *International journal of pharmaceutical investigation*, 7(2), 82–87. https://doi.org/10.4103/jphi.JPHI_12_17
- Tang, C., Chen, J., Zhang, L., Zhang, R., Zhang, S., Ye, S., Zhao, Z., & Yang, D. (2020). Exploring the antibacterial mechanism of essential oils by membrane permeability, apoptosis and biofilm formation combination with proteomics analysis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 310(5), 151435. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151435>
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and disease*, 74(4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Umar, A.I., Garba, I., Jidda, M. L., Ganau, A. M., Fana, A.S., & Malami, F. A. (2019). Multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ear and wound swabs in some selected hospital laboratories in Sokoto Metropolis, Nigeria. *Calabar J. Health Sci.* 3(1), 31-35. https://doi.org/10.25259/CJHS_8_2019
- Veilleux, M. P., & Grenier, D. (2019). Determination of the effects of cinnamon bark fractions on *Candida albicans* and oral epithelial cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 303. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2730-2>
- Vitanza, L., Maccelli, A., Marazzato, M., Scazzocchio, F., Comanducci, A., Fornarini, S., Crestoni, M. E., Filippi, A., Frascchetti, C., Rinaldi, F., Aleandri, M., Goldoni,

- P., Conte, M. P., Ammendolia, M. G., & Longhi, C. (2019). *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microbial pathogenesis*, *126*, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.025>
- Wang, D., Yuan, J., Gu, S., & Shi, Q. (2013). Influence of fungal elicitors on biosynthesis of natamycin by *Streptomyces natalensis* HW-2. *Applied microbiology and biotechnology*, *97*, 5527-5534. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4786-0>
- Wang, M., Yang, C., François, J. M., Wan, X., Deng, Q., Feng, D., Deng, S., Chen, S., Huang, F., Chen, W., & Gong, Y. (2021). A Two-step strategy for high-value-added utilization of rapeseed meal by concurrent improvement of phenolic extraction and protein conversion for microbial iturin a production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *9*, 735714. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.735714>
- Wang, T., Shao, J., Da, W., Li, Q., Shi, G., Wu, D., & Wang, C. (2018). Strong synergism of palmatine and fluconazole/itraconazole against planktonic and biofilm cells of *Candida* species and efflux-associated antifungal mechanism. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2892. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02892>
- Warraich, A. A., Mohammed, A. R., Perrie, Y., Hussain, M., Gibson, H., & Rahman, A. (2020). Evaluation of anti-biofilm activity of acidic amino acids and synergy with ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Scientific reports*, *10*(1), 9021. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66082-x>
- Weterings, V., Veenemans, J., Kleefman, A., den Bergh, M. K., Mulder, P., Verhulst, C., Willemsen, I., & Kluytmans, J. (2019). Evaluation of an in vitro model with a novel statistical approach to measure differences in bacterial survival of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on an inanimate surface. *Antimicrobial resistance and infection control*, *8*, 106. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0558-7>

- Wijesinghe, G. K., de Oliveira, T. R., Maia, F. C., de Feiria, S. B., Barbosa, J. P., Joia, F., Boni, G. C., & Höfling, J. F. (2021). Efficacy of true cinnamon (*Cinnamomum verum*) leaf essential oil as a therapeutic alternative for *Candida* biofilm infections. *Iranian journal of basic medical sciences*, *24*(6), 787–795. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.53981.12138>
- Xu, M., Shi, Y., Fan, D. L., Kang, Y. J., Yan, X. L., & Wang, H. W. (2023). Co-culture of white rot fungi *Pleurotus ostreatus* P5 and *Bacillus amyloliquefaciens* B2: a strategy to enhance lipopeptide production and suppress of fusarium wilt of cucumber. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *9*(11), 1049. <https://doi.org/10.3390/jof9111049>
- Yang, W., Liu, J., Blažeković, B., Sun, Y., Ma, S., Ren, C., Vladimir-Knežević, S., Li, C., Xing, Y., Tian, G., & Wang, Y. (2018). *In vitro* antibacterial effects of tanreqing injection combined with vancomycin or linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC complementary and alternative medicine*, *18*(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2231-8>
- Yasir, M., Dutta, D., & Willcox, M. D. P. (2021). Enhancement of antibiofilm activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* by Administration of antimicrobial peptides. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *10*(10), 1159. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101159>
- Yong, J., Zu, R., Huang, X., Ge, Y., & Li, Y. (2020). Synergistic effect of berberine hydrochloride and fluconazole against *Candida albicans* resistant isolates. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1498. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01498>
- Yu, H. H., Kim, K. J., Cha, J. D., Kim, H. K., Lee, Y. E., Choi, N. Y., & You, Y. O. (2005). Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of medicinal food*, *8*(4), 454–461. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.454>
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, *9*(6), e1403. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>

- Zhao, L., Wang, S., Li, X., He, X., & Jian, L. (2020). Development of in vitro resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial resistance and infection control*, 9(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00793-8>
- Zhu, B., Li, Z., Yin, H., Hu, J., Xue, Y., Zhang, G., Zheng, X., Chen, W., & Hu, X. (2022). Synergistic antibiofilm effects of pseudolaric acid a combined with fluconazole against *Candida albicans* via inhibition of adhesion and yeast-to-hypha transition. *Microbiology spectrum*, 10(2), e0147821. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01478-21>

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А. Акт впровадження результатів науково-дослідної роботи у навчальний процес

Міністерство освіти і науки України
Національний університет харчових технологій

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

 Сергій ТОКАРЧУК

«10» січня 2024 р.



АКТ

впровадження результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських і дисертаційних робіт у навчальний процес вищих навчальних закладів

Замовник Національний університет харчових технологій в особі проректора з наукової роботи **ТОКАРЧУКА Сергія**, який діє на підставі наказу № 87 від 20.10.22 р. _____
(П.І. прізвища)

Дійсним актом підтверджується, що результати:

проєкту МОН фундаментальних наукових досліджень за рахунок видатків держаного бюджету (секція 24 «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології») _____
(найменування виду роботи)

Комплексні мікробні препарати мультифункціонального призначення: від регуляції біосинтезу та властивостей до перспектив практичного використання. Державний реєстраційний номер: 0119U002575 _____
(найменування тем, № держ. реєстрації)

виконаного у проблемній науково-дослідній лабораторії _____
(найменування кафедри)

виконуваного з 1 січня 2019 по 31 грудня 2021 _____
(термін виконання)

впроваджені у навчальний процес кафедри біотехнології і мікробіології _____

1. Вид впроваджених результатів: одержання поверхнево-активних речовин, синтезованих в різних умовах культивування та їх використання у комплексі з різними біоцидами як альтернативи класичним антибактеріальним засобам у боротьбі з патогенними мікроорганізмами.

2. Форма впровадження: модулі навчальних дисциплін «Інтенсифікація технологій мікробного синтезу» та «Біотехнологічні студії» для підготовки докторів філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія».

3. Новизна результатів науково-дослідних робіт: Нині неконтрольоване використання антибіотиків, недотримання терапевтичних доз та нерациональний їх підбір є основними причинами поширення резистентності патогенних

мікроорганізмів. Комерційні антибіотики і антифунгальні препарати здебільшого не здатні інгібувати мутьїрезистентні штами, патогенез яких зумовлений в тому числі й здатністю до формування біоплівок. Одним з стратегічних підходів до підвищення ефективності антимікробних сполук є використання їх у комбінації з іншими природними речовинами.

Серед таких речовин перспективними є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), яким притаманний широкий спектр біологічних властивостей (антимікробна, антиадгезивна активність та здатність до руйнування біоплівок), що роблять їх потенційними агентами для використання у багатьох галузях промисловості. Разом з тим, відомо що мікробні ПАР синтезуються у вигляді комплексу вторинних метаболітів, склад і властивості яких можуть змінюватися залежно від умов культивування продуцента, що потрібно враховувати при розробці технології їх практичного використання. Встановлено, що незалежно від умов культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 та *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, синтезовані поверхнево-активні речовини проявляли синергізм біологічної активності (антибактеріальної, антифунгальної, антиадгезивної дії та ролі у руйнуванні одно- та двовидових біоплівок) у комплексі з антибіотиками, антифунгальними препаратами та ефірними оліями.

4. Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких викладені результати НДР: Результати наукових досліджень увійшли до курсів лекцій з дисциплін «Загальна біотехнологія», «Загальна мікробіологія» для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр», «Природознавча мікробіологія» для здобувачів освітнього ступеня «магістр» спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія», а також використані у курсовому та дипломному проектуванні.

5. Соціальний і науково-технічний ефект: Поверхнево-активні речовини, синтезовані *R. erythropolis* IMB Ac-5017 *A. calcoaceticus* IMB B-7241, проявляють синергізм антибіотеріальної та антифунгальної активності з комерційними антибіотиками, антифунгальними препаратами та ефірними оліями, що дає змогу їх розглядати як комплексні препарати для зовнішнього застосування у ветеринарії, для обробки та дезінфекції приміщень, інвентарю, обладнання у складі мийно-дезінфікуючих засобів.

Збільшення у 1,3-3,5 рази ступеня руйнування біоплівок за дії суміші ПАР, синтезованих у різних умовах культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 *A. calcoaceticus* IMB B-7241, порівняно з використанням монопрепаратів дає змогу використати такі суміші як перспективні складові «антифунгальних» та «антибактеріальних замків»

Керівник НДР



(підпис)

(Пирог Т.П.)
(ініціали, прізвище)

«10» січня 2024 р.

ВИКОНАВЕЦЬ



(підпис)

(Ключка І.В.)
(ініціали, прізвище)

«10» січня 2024 р.

ДОДАТОК В. Список наукових праць за темою дисертації

Статті у наукових виданнях

1. Pirog, T., Kliuchka, I., Kliuchka L. (2023). Synergism of biological activity a mixture of essential oils and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants, synthesized in the presence of eukaryotic inducer. *Ukrainian Food Journal*, 12(3), 458-472. doi: 10.24263/2304-974X-2023-12-3-11

<https://ufj.nuft.edu.ua/indexpreen.html?doi=10.24263/2304-974X-2023-12-3-11>

«*Ukrainian Food Journal*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 358 від 15.03.2019); міжнародна індексація *Emerging Sources Citation Index* (складова **Web of Science**), **Scopus**.

2. Pirog, T., Kliuchka, I., Kliuchka L. (2022). Antimicrobial activity of a mixture of surfactants produced by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 with antifungal drugs and essential oils. *Ukrainian Food Journal*, 11(1), 176-186. doi: 10.24263/2304-974X-2022-11-1-16

<http://ufj.ho.ua/Archiv/UKRAINIAN%20FOOD%20JOURNAL%202022%20V.11%20Is.1.pdf>

«*Ukrainian Food Journal*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 358 від 15.03.2019); міжнародна індексація *Emerging Sources Citation Index* (складова **Web of Science**), **Scopus**.

3. Pirog, T., Kliuchka, I., Kliuchka L. (2022). Industrial wastes as substrates for synthesis of surfactants with antiadhesive activity by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017. *Ukrainian Journal of Food Science*, 10 (1), 32-40. doi: 10.24263/2310-1008-2022-10-1-7

<http://ukrfoodscience.ho.ua/Archiv/Ukr%20Jour%20Food%20Sci%20V%2010%20I%201.pdf>

«*Ukrainian Journal of Food Science*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія Б

(Наказ МОН України № 1643 від 28.12.2019); міжнародна індексація EBSCO, Google Scholar, Index Copernicus, Universal Impact Factor, Directory of Open Access Scholarly Resources, CAS Source Index.

4. Пирог, Т.П., Ключка, І.В., Ключка, Л.В. (2022). Вплив інактивованих клітин конкурентних мікроорганізмів на біологічну активність поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017. *Наукові праці НУХТ*, 28(2), 24-35. doi: 10.24263/2225-2924-2022-28-2-4

<https://drive.google.com/file/d/1U2IWNgZs2IJMP5KkGX7gq5oaqo6LNCU>

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost*.

5. Пирог, Т. П., Ключка, Л. В., Ключка, І. В., Антонюк, С. І., Бахтій, О. Л., Жалюк, Д. В. (2020). Синергізм антимікробної активності суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 з іншими біоцидними сполуками. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 26 (5), 17-25. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-5-4.

<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/32587>

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, Google Scholar, EBSCOhost*.

6. Pirog, T.P., Kliuchka, I.V. (2024). Synergism of antimicrobial activity of antibiotics with biocides of natural origin. *Biotechnologia acta* (подано до друку у грудні 2023 р).

«*Biotechnologia acta*» входить у перелік фахових наукових видань за спеціальністю 162-Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ

Міністерства освіти і науки України № 1714 від 28.12.2016), міжнародна індексація: CrossRef, Google Scholar, Index Copernicus та ін.

Тези доповідей у матеріалах конференцій

1. Kliuchka, I.V. (2023). The use of surface-active substances synthesized by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on industrial waste for the destruction of bacterial and yeast biofilms. *«Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVII Міжнародної науково-практичної конференції*, Київ, Травень 19, 2023, с 45-46.

2. Ключка, І.В., Жалюк, Д.В., Пирог, Т.П. (2023). Роль комплексу антибіотиків та поверхнево-активних речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 у деструкції двовидових біоплівки бактерій. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології: матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фармацевт. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича*, Харків, Україна, Травень 10-11, 2023, с 249-250.

3. Ключка, І., Жалюк, Д., Пирог Т. (2023). Роль у руйнуванні двовидових бактеріальних біоплівки комплексу антибіотиків та поверхнево-активних речовин, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 в різних умовах культивування. *Матеріали 89 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Квітень 3-7, 2023, с 409.

4. Ключка, І.В., Жалюк, Д.В., Пирог, Т.П. (2023). Руйнування двовидових біоплівки за дії комплексу антибіотиків та поверхнево-активних речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017. *Матеріали III міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»*, Харків, Березень 24, 2023, с 206-208.

5. Ключка, І.В., Ключка, Л.В., Пирог, Т.П. (2022). Синергізм антиадгезивної активності комплексу антибіотиків з поверхнево-активними речовинами, синтезованими в різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017. Програма та тези матеріалів XI Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції», Київ, Україна, Листопад 8, 2022, с 60-62.

6. Kliuchka, I.V., Pirog, T.P. (2022). Destruction of bacterial and yeast biofilms under the action of surfactants synthesized by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on industrial waste. Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології», Харків, Україна, Жовтень 13, 2022, с 20-22.

7. Kliuchka, I., Pirog, T. (2022) Synergistic effect on *Candida* genus yeast of a mixture of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants with other biocides. Матеріали II міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», Харків, Україна, Травень 20, 2022, с 24-26.

8. Kliuchka, I.; Pirog, T. (2022). Synergistic effect on yeast of a mixture of surfactants *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 with antifungal drugs and essential oils. Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», Київ, Україна, Квітень-Травень, 2022, с 297.

9. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Синергізм антифунгальної дії суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 з антифунгальними препаратами. Програма та тези матеріалів X Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції», Київ, Україна, Листопад 9-10, 2021, с 54-56.

10. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Деструкція біоплівки за дії комплексу мікробних поверхнево-активних речовин та лікарських засобів. *Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття»*, Київ, Україна, Квітень 23, 2021, с 50.

11. Ключка, І., Жалюк, Д., Пирог, Т. (2021). Синергічна дія на мікроорганізми поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 та ефірної олії чайного дерева. *Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Україна, Квітень 15-16, 2021, с 389.

12. Ключка, І., Бахтій, О., Пирог, Т. (2021). Антифунгальна активність комплексу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та ефірних олій кориці і лемонграсу. *Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Україна, Квітень 15-16, 2021, с 393.

13. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Руйнування біоплівки за дії суміші поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 та лікарських засобів. *Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині»*, Харків, Україна, Березень 26, 2021, с 131-132.

14. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Антифунгальна активність суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та ефірних олій. *Матеріали I міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»*, Харків, Україна, Березень 25, 2021, с 188-189.

15. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Деструкція біоплівки за дії комплексу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 та лікарських препаратів. *Матеріали I міжнародної науково-практичної*

Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», Харків, Україна, Березень 25, 2021, с 190-191.

16. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Руйнування біоплівки за дії комплексу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та лікарських препаратів. *Матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development»*, Харків, Україна, Березень 18-19, 2021, с 228-229.

17. Ключка, І.В., Пирог, Т.П. (2021). Синергізм антифунгальної та антимікробної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 у суміші з ефірними оліями. *Матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development»*, Харків, Україна, Березень 18-19, 2021, с 231-232.