

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПАРФЕНЮК Марії Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Еукаріотичні індуктори як фактор регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241

керівник роботи ПИРОГ Тетяна Павлівна, д.б.н., проф.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 913-к

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241; цільовий продукт: поверхнево-активні речовини.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вплив конкурентних мікроорганізмів на синтез та властивості вторинних метаболітів. Матеріали і методи досліджень. Біологічна активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1. Синергізм біологічної активності суміші ефірних олій та поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності еукаріотичного індуктора.

5. Перелік графічного матеріалу

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин (ПАР) за наявності у середовищі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 із очищеним гліцерином або відходами виробництва біодизелю біологічних індукторів (живих або інактивованих клітин *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1 чи відповідного супернатанту).

Встановили, що найефективнішими із досліджуваних індукторів виявилися живі клітини *S. cerevisiae* БТМ-1, за наявності у середовищі культивування яких як з очищеним гліцерином, так і відходами виробництва біодизелю було синтезовано ПАР, антимікробна активність яких щодо обраних тест-культур була у 9 – 162 разів вищою, ніж за використання ПАР, синтезованих без індуктора. Ступінь деструкції як бактеріальних, так і дріжджових біоплівки за дії препаратів (6,8 – 880 мкг/мл) був на 0,3 – 50% вищим, а адгезія тест-культур під впливом таких ПАР (11 – 88 мкг/мл) була на 1 – 71% нижчою, порівняно із дією ПАР, одержаних без індуктора.

Встановили, що за використання комплексу ефірних олій чайного дерева або кориці та ПАР, одержаних за внесення живих клітин БТМ-1 у середовище ІМВ В-7241 із гліцерином різної якості, мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) зазначених антимікробних сполук щодо бактерій і дріжджів були нижчими у 15 – 960 та 2,2 – 40 разів відповідно, ніж МІК таких монопрепаратів. Ступінь руйнування одно- та двовидових біоплівки при застосуванні суміші таких ПАР та ефірних олій були в 1,1 – 2 рази вищими, порівняно із встановленими показниками для антимікробних сполук, використовуваних окремо.

Пояснювальна записка складається зі вступу, 4 розділів, висновків та списку використаної літератури із 124 найменувань та додатку. Загальний обсяг роботи – 130 сторінок та 24 таблиці.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, гліцерин, індуктор, антимікробна дія, деструкція біоплівки, адгезія, синергізм, ефірні олії.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	1
ВСТУП	8
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	10
РОЗДІЛ 1. ВПЛИВ КОНКУРЕНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ НА СИНТЕЗ ТА ВЛАСТИВОСТІ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ.....	10
1.1. Мікроміцети як регулятори синтезу та біологічної активності вторинних метаболітів.....	10
1.1.1. Спільне культивування бактерій-продуцентів вторинних метаболітів з мікроміцетами	11
1.1.2. Синтез вторинних метаболітів бактеріями за наявності грибних індукторів	27
1.2. Дріжджі як регулятори синтезу та біологічної активності вторинних метаболітів	35
1.2.1. Спільне культивування продуцентів практично цінних метаболітів з дріжджами	35
1.2.2. Вплив дріжджових індукторів на синтез вторинних метаболітів бактеріями	38
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	42
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	42
2.1. Об'єкти досліджень.....	42
2.2. Культивування продуцента поверхнево-активних речовин	42
2.3. Підготовка еукаріотичного індуктора.....	43
2.4. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин та одержання препаратів ПАР.....	44
2.5. Визначення антимікробної активності ПАР	45
2.6. Дослідження впливу ПАР на ступінь деструкції біоплівки.....	46

2.7. Визначення антиадгезивної активності ПАР	46
2.8. Визначення антимікробної активності ефірної олії, ПАР та їх суміші	47
2.9. Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на ступінь деструкції біоплівок	49
2.10. Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на ступінь деструкції двовидових біоплівок, що складаються з двох бактерій	49
2.11. Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на ступінь деструкції двовидових біоплівок, що складаються з бактерій і дріжджів ..	50
РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> БТМ-1	52
3.1. Вплив дріжджового індуктора на антимікробну активність поверхнево- активних речовин	53
3.2. Деструкція біоплівок поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності індуктора.....	58
3.3. Вплив <i>S. cerevisiae</i> БТМ-1 у середовищі культивування <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 на антиадгезивну активність синтезованих поверхнево-активних речовин	69
РОЗДІЛ 4. СИНЕРГІЗМ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СУМІШІ ЕФІРНИХ ОЛІЙ ТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ ЕУКАРІОТИЧНОГО ІНДУКТОРА.....	78
4.1. Антимікробна активність комплексу поверхнево-активних речовин та ефірних олій	79
4.2. Деструкція мікробних біоплівок за дії комплексу поверхнево-активних речовин із ефірними оліями	88

4.3. Руйнування двовидових біоплівки за дії комплексу поверхнево-активних речовин з ефірними оліями	100
ВИСНОВКИ.....	107
Список використаної літератури	109
ДОДАТКИ.....	127

ВСТУП

З кожним роком доступність антибіотикотерапії провокує зростання кількості випадків резистентності до багатьох антибіотиків, що призводить до появи мультирезистентних мікроорганізмів (Huemer, Mairpady Shambat, Brugger, & Zinkernagel, 2020). Труднощі у лікуванні інфекцій, викликаних мультирезистентними збудниками, змушують дослідників до термінових пошуків нових антимікробних речовин із різними механізмами дії, і, якщо можливо, із меншими побічними ефектами на здоров'я людей, тварин і навколишнє середовище (Gan, Langa, Valenzuela, Ballesterro, & Pino-Otín, 2023).

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) із регульованою біологічною активністю завдяки своїм перевагам знаходять безліч застосувань у різних галузях промисловості. Біологічні ПАР виявляють високу біосумісність та біорозкладаність (De Oliveira et al., 2016), є менш токсичними та більш стабільними у різних умовах, у порівнянні із синтетичними ПАР, синтезуються широким колом мікроорганізмів, та є ефективними природними антимікробними агентами (Liwarska-Bizukojs, Olejnik, Delbeke, Van Geem, & Stevens, 2018).

Зокрема, ефективним механізмом регуляції активності таких антимікробних сполук є внесення у середовище культивування їх продуцентів конкурентних мікроорганізмів (індукторів). Переважна частина досліджень присвячена використанню бактеріальних індукторів у підвищенні концентрації (Alves, Sequeira, & Cunha, 2019; Chen et al., 2022) та/або біологічної активності ПАР (Alves, Sequeira, & Cunha, 2019; Hamza, Kumar, & Zinjarde, 2018; Gómez, Ramiro, Quesan, & de Melo Franco, 2016). Бактерії, використовувані більшістю дослідників, є патогенними або умовно-патогенними, що недопустимо у промислових масштабах.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Парфенюк М.А.</i>			<i>ВСТУП</i>		<i>8</i>	<i>138</i>
<i>Керівник</i>		<i>Пироз Т.П.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ</i>		

Зазначимо, що у доступній літературі інформація щодо використання непатогенних дріжджів роду *Saccharomyces* як індукторів для регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин мікробного походження відсутня.

Ефірні олії рослин вважаються також можливим джерелом нових природних антимікробних молекул із широким спектром інгібування, включаючи грампозитивні та грамнегативні бактерії, гриби, а також віруси. Використання таких натуральних молекул ускладнює або унеможливорює резистентність мікроорганізмів, які не можуть зазнавати відповідних мутацій до всіх активних молекул, одночасно присутніх в ефірних оліях (Feudjieu et al., 2023).

Застосування нижчих концентрацій обох натуральних агентів відкриває перспективні можливості для пошуку альтернатив лікування інфекційних захворювань, оскільки комбінації із синергічними ефектами можуть зменшити ймовірність появи резистентності, показуючи при цьому ефективні фармакологічні результати (Cheesman, Panko, Blonk, & Cock, 2017). З літератури відомо про синергізм біологічної активності ефірних олій з антибіотиками (Asadi et al., 2023; Parker, Gabriel, Graham, Butts, & Cornelison, 2022; Iseppi, Mariani, Benvenuti, Truzzi, & Messi, 2023) і з ПАР (Haba et al., 2014). Але інформація про використання ефірних олій із антимікробними сполуками, синтезованими за наявності у середовищі продуцента індукторів, зокрема дріжджових, у літературних джерелах відсутня.

Тому, зважаючи на вищезазначену інформацію, **мета даної роботи** – дослідити антимікробну та антиадгезивну активність, здатність до руйнування біоплівки, а також можливість синергізму біологічної дії із ефірними оліями ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю за наявності у середовищі культивування *S. cerevisiae* БТМ-1 як дріжджового індуктора.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ВПЛИВ КОНКУРЕНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ НА СИНТЕЗ ТА ВЛАСТИВОСТІ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

Системи спільного культивування мікроорганізмів займають центральне місце у розвитку синтетичної біології та є одними із методів посилення виробництва антимікробних вторинних метаболітів (Tan et al., 2019). Завдяки своїй універсальності, надійності та здатності виконувати складні завдання такі системи демонструють високий потенціал для біотехнологічного застосування (Hays, Patrick, Ziesack, Oxman, & Silver, 2015).

У результаті такого способу культивування спостерігається підвищення концентрації бажаного продукту (Zhi, Wu, & Xu, 2017; DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018; Atakpa et al., 2022) у культуральній рідині та/або його біологічної активності (Sung, Gromek, & Balunas, 2017; Bai et al., 2022), а також утворення нових сполук (Ueda, & Verpu, 2016; Yu et al., 2019), не характерних для монокультури.

1.1. Мікроміцети як регулятори синтезу та біологічної активності вторинних метаболітів

Усе більше з'являються публікації щодо дослідження спільного культивування продуцентів вторинних метаболітів із іншими конкурентними мікроорганізмами (зокрема еукаріотичними). Дослідники використовують спільне культивування бактерії-продуцента із грибами (DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018; Atakpa et al., 2022; Boruta, & Ścigaczewska, 2021) та грибними індукторами (Fifani et al., 2022; Sharma et al., 2017) аби покращити синтез цільових продуктів (Ola, Thomy, Lai, Brötz-Oesterhelt, & Proksch, 2013; Boruta, Ścigaczewska, & Bizukojć, 2022; Zhang et al., 2021), а також їх антибактеріальну і антифунгальну активність (Ola, Thomy, Lai, Brötz-Oesterhelt, & Proksch, 2013; Pan, Liu, Xu, Chen, & Cheng, 2021).

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 1. Вплив конкурентних мікроорганізмів на синтез та властивості вторинних метаболітів</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркциф</i>
<i>Розробник</i>	<i>Парфенюк М.А.</i>							
<i>Керівник</i>	<i>Плюг Т.П.</i>						10	137
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

1.1.1. Спільне культивування бактерій-продуцентів вторинних метаболітів з мікроміцетами

Поверхнево-активні речовини. У літературі представлена значна кількість інформації про спільне культивування бактеріальних продуцентів ПАР, які є вторинними метаболітами, із грибами. Такі відомості переважно стосуються біосинтезу ПАР представниками родів *Bacillus* (DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018; Pan, Liu, Xu, Chen, & Cheng, 2021; Chen et al., 2021; Ola, Thomy, Lai, Brötz-Oesterhelt, & Proksch, 2013), *Acinetobacter* (Zhang et al., 2021; Atakpa et al., 2022), *Paraburkholderia* (Yuan et al., 2018).

Для бактерій роду *Bacillus*, як продуцентів ПАР, характерним є утворення ліпопептидів – сурфактину, фенгіцину та ітурину А. При попередньому внесенні грибів родів *Aspergillus*, *Trichoderma* або *Fusarium* у середовище культивування бацил посилюється не тільки синтез цільових продуктів, а також їх антибактеріальна (Ola, Thomy, Lai, Brötz-Oesterhelt, & Proksch, 2013) та антифунгальна (Pan, Liu, Xu, Chen, & Cheng, 2021) активність. Можливою також є оптимізація виробництва ліпопептидів за використання в якості субстрату харчових відходів (Pan, Liu, Xu, Chen, & Cheng, 2021), а от компоненти ріпакового шроту мають здатність до інгібуючої дії щодо бактеріального продуцента (Chen et al., 2021).

Так, наприклад, дослідниками було описано вплив грибних клітин *Fusarium sambucinum* 2351, *Rhizopus stolonifer* 198 і *Verticillium dahliae* 175 на синтез антимікробних ліпопептидів бактеріальним штамом *Bacillus subtilis* B9-5 (DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018). Поживне середовище для біосинтезу містило у собі 20 г/л сахарози як субстрат (Mohamed et al., 2017).

Середовища були спільно засіяні 1 мл однієї з трьох суспензій спор грибів і 1 мл суспензії бактеріальних клітин. 1 мл бактеріальної суспензії без внесення грибів використовувався як контроль. Після 48 год вирощування при 30 °С (120 об/хв) проводили операції виділення та визначення концентрації ПАР. Було виявлено, що найефективнішим агентом виявилися

клітини *R. stolonifer* 198, при внесенні яких концентрація фенгіцину і сурфактину були на 37 і 15,4 % вищими, ніж концентрації ПАР у контрольному препараті (DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018).

Дослідниками (Pan, Liu, Xu, Chen, & Cheng, 2021) було проведено експеримент щодо спільного вирощування *B. amyloliquefaciens* NM618 (продуценту сурфактину) із грибними мікроорганізмами. Середовище для біосинтезу сурфактину містило гідролізат харчових відходів, дріжджовий екстракт та неорганічні солі. Мікроорганізми вирощували протягом 144 год, рН 7,5, 160 об/хв, але за різних температурних режимів – *Aspergillus oryzae* BNCC338380 і *Trichoderma reesei* BNCC337997 (37 °C), *A. nidulans* BNCC190203 (30 °C).

Після завершення процесу біосинтезу, було виявлено, що підвищилася не тільки кінцева концентрація утвореного ліпопептиду (у 2 – 30 разів), а і його антифунгальна активність проти *Rhizoctonia solani* та *Botrytis cinerea*. Посилення синтезу сурфактину може бути спричинене продукцією ферментів *A. oryzae* BNCC338380 (амілази та протеази) і *A. nidulans* BNCC190203 (ліпази), що розщеплюють складові обраного субстрату в амінокислоти та вільні жирні кислоти – попередники ліпопептиду.

У статті (Chen et al., 2021) було описано вплив спільного культивування продуцента ітуруну А – бактеріального штаму *B. amyloliquefaciens* CX-20 із еукаріотичними мікроорганізмами (*A. oryzae* 92011, *A. niger* 93027, *Trametes* sp. 48424). Дослідження показали, що при попередньому внесенні грибів у середовище культивування синтез такого ліпопептиду знижується у 1,5 – 5 разів. Як зазначають самі дослідники, спільне вирощування із грибними штамами може сприяти вивільненню пігментів і фенольних сполук із сильною антиоксидантною активністю із ріпакового шроту, тим самим проявляючи інгібуючий ефект на ріст *B. amyloliquefaciens* CX-20.

Авторами статті (Ola, Thomy, Lai, Brötz-Oesterhelt, & Proksch, 2013) було проведено дослідження щодо спільного культивування бактерій *B.*

subtilis 168 trpC2 і грибів *Fusarium tricinctum*. Вирощування посівного матеріалу до середини експоненційної фази (6 днів при 37 °C і 200 об/хв) *B. subtilis* 168 trpC2 проводили у лізогенному середовищі, а *F. tricinctum* – у солодовому агарі. Згодом бактерії та гриби культивували на молочному рисі протягом 6 діб в аналогічних умовах.

Спільне культивування призвело до 78-кратного підвищення концентрації синтезованих вторинних метаболітів, серед яких було виявлено ліпопептид фузаристатин А. Дослідження показали, що концентрація фузаристатину А за внесення грибного посівного матеріалу зростає у 8 разів, порівняно із синтетичними можливостями монокультури. Також завдяки присутності *F. tricinctum* у середовищі *B. subtilis* 168 trpC2 підсилюється синтез інших вторинних метаболітів – антибіотиків еніатинів В1 та А1 і латеропірону.

Спільна деградація нафтових відходів також може стимулювати синтез вторинних метаболітів. При спільному вирощуванні на нафті бактерій роду *Acinetobacter* із грибами *Talaromyces* sp. (Zhang et al., 2021) або *Scedosporium* sp. ZYY (Atakра et al., 2022) можливим є посилення синтезу ПАР. Але при внесенні грибів *Scedosporium boydii* F-3 у середовище культивування бактерій *Paraburkholderia* (Yuan et al., 2018) змін у продукції ПАР не спостерігається.

У дослідженні (Zhang et al., 2021) по спільній деградації нафти *Acinetobacter baumannii* культивували разом із *Talaromyces* sp. (1:1) протягом 7 діб при рН 9. Виявили, що швидкість деградації нафти співкультурою зростає до 72,57 % порівняно із бактеріальною монокультурою (58,24 %). Також спостерігалось зниження загального поверхневого натягу із 72,50 (чиста вода) до 48,28 мН/м. Вищенаведені результати свідчать про підвищену продукцію ПАР, обраною співкультурою.

При спільному культивуванні бактерій *Acinetobacter* sp. Y2 та грибів *Scedosporium* sp. ZYY протягом 7 діб на такому субстраті як нафта, можливим є зниження загального поверхневого натягу культури із 63,12 до

47,58 мН/м. Крім того, зріс показник деградації нафтових вуглеводнів із 23,36 до 58,61 %. Такі результати вказують на посилений синтез ПАР за внесення у середовище культивування грибного інокуляту (Atakra et al., 2022).

Науковцями (Yuan et al., 2018) також описано спільне культивування бактерій *Paraburkholderia* sp., *Paraburkholderia tropica* за використання як конкурентного мікроорганізму клітин *Scedosporium boydii* F-3. Вирощування співкультури проводили протягом 7 діб при 30 °С (120 об/хв) у рідкому середовищі з нафтою (1 %), із додаванням інокуляту гриба у співвідношенні до бактерій 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3.

За співвідношення посівного матеріалу бактерій і гриба 3:1 спостерігали найбільше зниження поверхневого натягу культури (63,5 мН/м) порівняно із значенням у контролі (68 мН/м). Можна було б зробити висновок про збільшення синтезу ПАР, однак автори статті зазначають, що зниження показника поверхневого натягу є незначним, а, отже, конкурентний мікроорганізм практично не впливав на синтез ПАР бактеріальним продуцентом.

Антибіотики. У літературних джерелах зустрічається інформація щодо біосинтезу антибіотиків шляхом спільного культивування бактеріальних продуцентів роду *Streptomyces* із грибами (Boruta, & Ścigaczewska, 2021; Boruta, Ścigaczewska, & Bizukoć, 2021; Boruta, Ścigaczewska, & Bizukoć, 2022). У таких статтях зазначається, що гриби роду *Aspergillus* найкраще посилюють синтез окситетрацикліну (Boruta, & Ścigaczewska, 2021; Boruta, Ścigaczewska, & Bizukoć, 2021) і ністатину А (Boruta, Ścigaczewska, & Bizukoć, 2022) актиноміцетами при спільному рості на вуглецевих субстратах (лактозі або глюкозі).

Науковцями (Boruta, & Ścigaczewska, 2021) було проведено дослідження по спільному культивуванню *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 із різними грибними штамми (*Penicillium rubens* ATCC 9178 і *A. niger* ATCC 204447). Мікроорганізми вирощували протягом 96 год (28 °С, рН 7, 110 об/хв) на вуглецевому субстраті (глюкоза), в якості джерела азотного

живлення використовували сульфат амонію. Спільне культивування таких мікроорганізмів призвело до незначного посилення продукції антибіотику окситетрацикліну на 13 та 5 % відповідно.

Надалі продовжувалися дослідження (Boruta, Ścigaczewska, & Bizukoć, 2021) щодо культивування вищеописаного штаму-продуцента (*S. rimosus* ATCC 10970) із іншим конкурентним мікроорганізмом – *Aspergillus terreus* ATCC 20542. Спільне вирощування таким мікроорганізмів проводили у ферментері з робочим об'ємом 5,5 л при 220 – 300 об/хв за різних концентрацій обраних субстратів (глюкоза і лактоза). Результати показали, що при вирощуванні *S. rimosus* ATCC 10970 із *A. terreus* ATCC 20542 протягом 48 год на лактозі (20 г/л) посилювалася продукція окситетрацикліну (18 мг/л), порівняно із синтезом монокультурою (13 мг/л).

Відомо про ще одне дослідження (Boruta, Ścigaczewska, & Bizukoć, 2022) по спільному культивуванню актиноміцетів (*Streptomyces noursei* ATCC 11455) із міцеліальними грибами (*A. terreus* ATCC 20542). Вирощування проводили у колбах на качалках при рН 6,5 за використання в якості субстрату 2 вуглецевих сполук (лактоза і глюкоза). Виявили, що при попередньому внесенні грибового конкурентного мікроорганізму підвищується синтез ністатину А1 (більше ніж у 2 рази), але тільки після 144 год культивування.

Як зазначалося вище (Ola, Thomy, Lai, Brötz-Oesterhelt, & Proksch, 2013), при спільному вирощуванні *B. subtilis* 168 trpC2 і грибів *Fusarium tricinctum* можливим є утворення і антибіотиків. Еніатини В1 і А1 пригнічували ріст спільно культивованого штаму *B. subtilis* з мінімальними інгібуючими концентраціями (МІК) 16 і 8 мкг/мл відповідно, а також були активними проти *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* та *Enterococcus faecalis* зі значеннями МІК у діапазоні 2–8 мкг/мл. Так само антибіотик латеропірон, який конститутивно був присутній у *F. tricinctum*, продемонстрував високу антибактеріальну активність проти *B. subtilis*, *S.*

aureus, *S. pneumoniae* та *E. faecalis* із значеннями МІК у діапазоні від 2 до 8 мкг/мл.

Узагальнені відомості щодо впливу спільного вирощування бактерій із грибами на утворення вторинних метаболітів наведено у *табл. 1.1*.

Таблиця 1.1

Вплив спільного культивування бактерій-продуцентів із клітинами еукаріот на синтез вторинних метаболітів

Продуцент	Конкурентний мікроорганізм	Середовище для підготовки продуцента/ конкурентного м/о	Субстрат	Концентрація вторинних метаболітів Монокультура / співкультура	Література
<i>Bacillus subtilis</i> B9-5	<i>Rhizopus stolonifer</i> 198	Триптон-соєвий агар / Картопляно-декстрозний агар	Сахароза	Фенгіцин: 27 / 37 мкг/мл; сурфактин: 3,25 / 3,75 мкг/мл	DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018
<i>Bacillus subtilis</i> 168 trpC2	<i>Fusarium tricinctum</i>	Лізогенне середовище / Солодовий агар	Глюкоза	Фузаристатин А: 10,05 / 79,40 мг/л	Ola, Thomy, Lai, Brötz- Oesterhelt, & Proksch, 2013
				Еніатин В1: 2,44 / 88,54 мг/л; еніатин А1: 0,28 / 21,85 мг/л; еніатин В: 3,4 / 4,85 мг/л; латеропірон: 8,78 / 79,58 мг/л	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HM618	<i>Yarrowia lipolytica</i> YL21	Дріжджовий екстракт-пептоно- декстрозний агар	Глюкоза	Фенгіцин: 10,52 / 76,19 мг/л; сурфактин: 15,89 / 192,80 мг/л; ітурин А: 9,69 / 31,32 мг/л	Bai et al., 2022
<i>Lactococcus lactis</i> sub sp. <i>lactis</i> UTMС 106	<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 18942	Посівне середовище I (сахароза, дріжджовий екстракт, пептон, неорганічні солі) / Посівне середовище II (дріжджовий екстракт, пептон, гліцерин)	Меляса	Нізин: 176 / 270 мг/л	Ariana, & Hamedi, 2017

Продовження табл. 1.1

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Fusarium tricinctum</i>	Середовище Мюллера-Хінтона	Молочний рис	Феназин-1-карбонова кислота: –* / 85,1 ± 75,1 мг/л Феназин-1-карбоксамід: – / 7,5 ± 8,5 мг/л 2-гептил-4-гідроксихінолон: – / 26,1±11,4 мг/л		Moussa, Ebrahim, Kalscheuer, Liu, & Proksch, 2020
<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Середовище Лурія-Бертані / Посівне середовище (глюкоза, амінокислотна суміш)	Ксилоза	Нарінгенін: 19,94 / 21,16 ± 0,41 мг/л		Zhang et al., 2017
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HM618	<i>Pichia pastoris</i> GS115-amy70	Дріжджовий екстракт-пептоно-декстрозний агар	Кухонні відходи	Фенгіцин	2,4 / 15,9 мг/л	Wang, Miao, Qiao, Xu, & Cheng, 2022
	<i>Pichia pastoris</i> GS115-lip7				2,4 / 4,6 мг/л	
<i>Streptomyces rimosus</i> ATCC 10970	<i>Penicillium rubens</i> ATCC 9178	Солодово-дріжджо-декстрозний агар / картопляно-декстрозний агар	Глюкоза	Окситетрациклін	3,5 / 3,95 мг/л	Boruta, & Ścigaczewska, 2021
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 204447	Солодово-дріжджо-декстрозний агар / солодово-казеїно-пептонний ага			3,5 / 3,65 мг/л	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CX-20	<i>Aspergillus oryzae</i> 92011	Середовище Лурія-Бертані / Середовище твердофазної ферментації (ріпаковий шрот, пшеничні висівки)	Глюкоза, ріпаковий шрот	Ітурин А	1,25 / 0,93 г/л	Chen et al., 2021
	<i>Aspergillus niger</i> 93027				1,25 / 0,6 г/л	
	<i>Trametes</i> sp. 48424				1,25 / 0,27 г/л	

Закінчення табл. 1.1

<i>Streptomyces noursei</i> ATCC 11455	<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	Щільне середовище I (дріжджовий екстракт, солодовий екстракт, декстроза, агар) / Щільне середовище II (солодовий екстракт, казеїновий пептон, агар)	Лактоза, глюкоза	Ністатин A1	15,6 / 32,5 мг/л	Boruta, Ścigaczewska, & Bizukojć, 2022
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HM618	<i>Aspergillus oryzae</i> BNCC338380	Посівне середовище I (пептон, яловичий екстракт, дріжджовий екстракт, глюкоза, натрію хлорид) / Посівне середовище II (картопля, глюкоза, тіамін, неорганічні солі)	Харчові відходи	Сурфактин	203,67 / 5878,5 мг/л	Pan, Liu, Xu, Chen, & Cheng, 2021
	<i>Trichoderma reesei</i> BNCC337997				203,67 / 425,98 мг/л	
	<i>Aspergillus nidulans</i> BNCC190203				203,67 / 654,04 мг/л	

Примітка:

* – не було виявлено у монокультурі

Інші метаболіти з антимікробними властивостями. В умовах спільного культивування із еукаріотичним мікроорганізмом можливим є утворення нових антимікробних метаболітів, не характерних для монокультури бактерії-продуцента. Зокрема, такими продуцентами виступають прокаріоти родів *Bacillus* (Ola, Thomy, Lai, Brötz-Oesterhelt, & Proksch, 2013; Wu et al., 2018; Li et al., 2020), *Streptomyces* (Wakefield, Hassan, Jaspars, Ebel, & Rateb, 2017; Yu et al., 2019; Wang et al., 2014; Khalil, Cruz-Morales, Licon-Cassani, Marcellin, & Capon, 2019), *Pseudomonas* (Moussa, Ebrahim, Kalscheuer, Liu, & Proksch, 2020) та *Acinetobacter* (Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Метаболіти, утворені шляхом культивування *Bacillus* і *Trichoderma* (Wu et al., 2018; Li et al., 2020), *Streptomyces* і *Rhinochadiella* (Yu et al., 2019), або *Fusarium* (Zawawi et al., 2022) характеризуються вищою антимікробною активністю. При вирощуванні продуцентів *Pseudomonas* і *Acinetobacter* із грибами *Fusarium* і *Trichoderma* відповідно на рисовому середовищі активізується синтез нових вторинних метаболітів, зокрема фенанзинів (Moussa, Ebrahim, Kalscheuer, Liu, & Proksch, 2020) та борелідинів (Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Науковці (Wu et al., 2018) описали спільне вирощування бактеріального штаму *B. amyloliquefaciens* ACCC11060 із грибом *Trichoderma asperellum* GDFS1009. Процес культивування проходив при 180 об/хв і 28 °C протягом 3 діб, за внесення 1,9 мл бактерій і 1 мл грибів у середовище, що містило яловичий екстракт.

Одержані під час біосинтезу речовини були ідентифіковані як 4-гідроксибензойна кислота, апігенін, гліцин бетаїн, ніотинова кислота. Антимікробний ефект щодо *Botrytis cinerea* від спільного культивування був на порядки вищим ($66,86 \pm 2,14\%$), ніж від вирощування бактеріальної ($58,89 \pm 1,34\%$) або грибної ($30,67 \pm 0,95\%$) монокультури. Однак при проведенні експерименту у заданих умовах, але внесенні мікроорганізмів у співвідношенні 1:1, антимікробна активність знижувалася ($47,86 \pm 0,51\%$).

Вченими (Li et al., 2020) було проведено дослідження по вирощуванню монокультури *B. subtilis* 22, а також спільному культивуванню такого продуценту із клітинами грибів. Під час спільного вирощування *B. subtilis* 22 і *Trichoderma atroviride* SG3403 на меласі протягом 2 діб при 28 °C і 180 об/хв одержали такі антимікробні метаболіти як конінгінін А, мевастатин, 11-дезацетоксивортманін, спіролактони. Метаболіти від спільного культивування та монокультури *B. subtilis* 22 фільтрували через мембрану Millex 0,22 мкм для видалення біомаси. Потім 1 мл супернатанту з обох дослідів змішували з 50 мл картопляно-декстрозного агару (50 °C) у співвідношенні 1:50 (об./об.).

Визначення антимікробної активності отриманих сполук проводили внесенням тест-культури *Fusarium graminearum* у центр чашки, що містила метаболіти, синтезовані співкультурою або метаболіти монокультури, із подальшим культивуванням при 28 °C протягом 5 днів. Виявили, що спільне культивування бактерій із грибами посилює антимікробний ефект одержаних вторинних метаболітів. Ступінь інгібування фільтрату *B. subtilis* 22 складав 42,9 %, а *B. subtilis* 22 і *T. atroviride* SG3403 – 61,5 %. Дія антимікробних сполук співкультури полягала у деградації клітинної стінки та цитоплазми гіфів *F. graminearum*.

При спільному культивуванні бактерій *B. subtilis* із грибами *Aspergillus sydowii* на чашках із картопляно-декстрозним агаром протягом 12 діб за температури 28 °C можливим є утворення нових антимікробних сполук – (7S)-10-гідроксидеканової кислоти, сидонату серину, макролактину U' (Sun et al., 2021; Sun et al., 2022). Після культивування за таких умов зони конфронтації збирали та замочували в етилацетаті для екстракції отриманих метаболітів. Екстракт далі випарювали при зниженому тиску. Потім неочищений екстракт піддавали розділенню на колонці з силікагелем і градієнтним елююванням, використовуючи N-гексан/дихлорметан (90:10 → 0:100 протягом 30 хв, 0:100 витримували протягом 10 хв) зі швидкістю потоку 12 мл/хв. У результаті поділу було отримано три фракції,

які згодом розділяли за допомогою препаративної ВЕРХ з ацетонітрилом- H_2O (швидкість потоку 20 мл/хв).

Так, авторами статті (Wakefield, Hassan, Jaspars, Ebel, & Rateb, 2017; Boruta, & Ścigaczewska, 2021) було виявлено, що при спільному вирощуванні *Streptomyces leeuwenhoekii* C58 і *Aspergillus fumigatus* MR2012 за використання в якості субстрату глюкози, синтезуються такі вторинні метаболіти як чаксапептин, сесквітерпенова пенталенова кислота, нокардамін.

Посівну культуру кожного із штамів готували шляхом інокуляції 50 мл рідкого середовища ISP2 окремої колонії бактерій або грибного міцелію, відповідно, та подальшої інкубації протягом 3 днів при 30 °C та перемішуванні при 180 об/хв. Далі 2,5 мл одержаного інокуляту вносили у 250 мл поживного середовища. Зазначається, що при вирощуванні монокультури актиноміцетів утворення вищеописаних сполук не спостерігалось.

Під час експерименту (Yu et al., 2019) актиноміцет *S. rochei* MB037 і гриб *Rhinocladiella similis* 35 культивували у середовищі ISP2, що містило у своєму складі солодовий екстракт (10 г), безводну декстрозу (4 г), дріжджовий екстракт (4 г) в 1 л штучної морської води при рН 7,0 та температурі 28°C із перемішуванням 180 об/хв. На 3-й день 200 мл культури актиноміцетів інокулювали у кожні 200 мл грибкових культур (1:1 об'єм/об'єм), щоб розпочати експеримент спільного культивування (11 діб). Як контроль використовували культивування монокультури протягом 2 тижнів.

У результаті хроматографічного аналізу було, виявлено, що співкультура, окрім борелідину та борелідину F, здатна до синтезу таких полікетидів як борелідини J і K, а також нової природної сполуки – 7-метокси-2,3-диметилхромон-4-он. Продукція нових важливо цінних метаболітів, як зазначають самі науковці, зумовлена активацією специфічних генів вторинного метаболізму грибів, що замовчуються при «класичному»

процесі культивування. Показано, що борелідин J виявив значну антибактеріальну активність проти метицилін-резистентного штаму *S. aureus* зі значенням МІК 0,195 мкг/мл у порівнянні із контрольним ципрофлоксацином (0,313 мкг/мл).

У ході досліджень (Wang et al., 2014) було виявлено, що спільне культивування *S. fradiae* 007 із *Penicillium* sp. WC-29-5 призводить до синтезу 4 ароматичних полікетидів, раніше не утворюваних даними мікроорганізмами. Вирощування проводили на суміші субстратів (глюкоза, мальтоза, маніт) при 28 °С, 160 об/хв протягом 2 діб. Отримані сполуки було ідентифіковано як дезоксифунікон, альтернаріол, вермістатин, (9R,14S)-епокси-11-дезоксифунікон, (9S,14R)-епокси-11-дезоксифунікон.

Під час спільного вирощування *Streptomyces* sp. SUK10 із *Fusarium* sp. F7S15 (Zawawi et al., 2022) також спостерігалось утворення нових антимікробних сполук: наразин D, семіноліпід, олігоміцин А, ікозалід А1, ікозалід А3. Спільне вирощування мікроорганізмів проводили за температури 28 °С, рН 7,2 – 7,4 та 150 об/хв. Грибні клітини вносили у середовище культивування стрептоміцетів на 7-му добу та проводжували вирощування співкультури до 15 діб. Одержані таким чином метаболіти екстрагували етилацетатом у співвідношенні 1:2, гомогенізували та фільтрували. Далі суміш концентрували під вакуумом за допомогою роторного випарника.

Антибактеріальну активність таких екстрактів визначали за диско-дифузійним методом, як описувалося раніше (Assaw et al., 2020). Після 2-кратних розведень екстрактів у диметилсульфоксиді (ДМСО) проводили визначення МІК щодо грам-негативних та грам-позитивних тест-культур. Було виявлено, що екстракт співкультури проявляє незначну антибактеріальну активність щодо *Micrococcus* sp. і *S. aureus* зі значеннями МІК 5 мг/мл і 10 мг/мл відповідно порівняно із неактивним екстрактом монокультури щодо таких тест-організмів. Результати також показали, що

отримані екстракти не виявляють антимікробну дію щодо грам-негативних мікроорганізмів.

За спільного культивування на морському бульйоні *Streptomyces sp.* CMB-StM0423 і *Aspergillus sp.* CMB-AsM0423 здатні продукувати геронапірол В – метаболіт, не характерний для бактерії-продуцента (Khalil, Cruz-Morales, Licon-Cassani, Marcellin, & Capon, 2019). Вирощування таких мікроорганізмів проводили за використання 24-лункової мікробіореакторної системи (Khalil, Kalansuriya, & Capon, 2014). У кожен лунку вносили поживне середовище (1,5 мл), 20 лунок інокулювали клітинами стрептоміцетів і грибів (15 мкл), а чотири лунки залишали контрольними (вносили тільки культури стрептоміцетів). Планшети із мікробіореакторами інкубували при 190 об/хв при 27°C до досягнення оптимального росту співкультури. Як зазначають самі автори статті, бактеріостатичний метаболіт грибів цикло-(L-феніл-транс-4-гідрокси-L-пролін) стимулює *Streptomyces* до продукції оксиду азоту (NO), який, у свою чергу, опосередковує транскрипційну активацію мовчазного кластера біосинтетичних генів для біосинтезу фунгістатичного геронапіролу В.

Дослідниками (Meschke, Walter, & Schrempf, 2012) було описано вирощування співкультури *Streptomyces lividans* 66 і *Verticillium dahlia*, що призвело до утворення ундецилпродигіозину, що не синтезувався у період росту монокультури. Одержаний метаболіт виявляв сильну антимікробну дію щодо гіф та мікросклероцій *V. dahliae* тим самим порушуючи специфічні шляхи передачі сигналу та апоптоз грибкового збудника рослин.

Утворення нових антимікробних сполук було досліджено під час спільного культивування *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 із *Fusarium tricinctum* (Moussa, Ebrahim, Kalscheuer, Liu, & Proksch, 2020). Біосинтез вторинних метаболітів проходив у колбах за температури 37 °C при використанні рису в якості субстрату. Автори зазначають, що утворення сполук – фенанзинів, не характерних для бактерії-продуцента обумовлено впливом гриба на мовчазний кластер бактеріального гену *P. aeruginosa*. Same

це призводить до активації системи захисту бактерій шляхом виробництва протигрибкових і кворум-чутливих молекул, а саме феназин-1-карбонової кислоти, феназин-1-карбоксаміду та 2-гептил-4-гідроксихінолону.

Також проводилося дослідження (Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2018) по спільному вирощуванню *Acinetobacter johnsonii* B2 і *Trichoderma* sp. 307 на рисовому середовищі. Такі культури інкубували при 28 °C протягом 28 діб у статичних умовах і при денному світлі. Після завершення біосинтезу одержану культуральну рідину тричі екстрагували, а неочищений екстракт далі розділяли на 11 фракцій за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі.

При такому культивуванні було одержано мікросферопсисини В, С- (3R, 7R)-7-гідрокси-де-О-метиллазіодиплодин, (3R)-5-оксо-де-О-метиллазіодиплодин, (3R)-7-оксо-де-О-метиллазіодиплодин (Zhang et al., 2017) та боттріородін Н (Zhang et al., 2018). Утворений боттріородін Н виявляв інгібіторну активність щодо α -глюкозидази з IC_{50} в діапазоні від 8,1 до 54,1 мкМ, а також сильну цитотоксичність проти клітинних ліній MMQ і GH3 зі значеннями IC_{50} 3,09 і 3,64 мкМ.

Узагальнена інформація про утворення нових вторинних метаболітів наведена у табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Вплив спільного культивування бактерій-продуцента із еукаріотичними організмами на синтез нових антимікробних сполук

Продуцент	Конкурентний мікроорганізм	Субстрат	Продукти, не характерні для монокультури	Література
<i>Bacillus atyloliquefaciens</i> ACCC11060	<i>Trichoderma asperellum</i> GDFS1009	Яловичий екстракт	4-гідроксибензойна кислота Апігенін Гліцин бетаїн Нікотинова кислота	Wu et al., 2018
<i>Bacillus subtilis</i> 22	<i>Trichoderma atroviride</i> SG3403	М'яса	Конінгін А Мевастатин 11-Дезацетоксивортманін Спіролактони	Li et al., 2019

Продовження табл. 1.2

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Fusarium tricinctum</i>	Молочний рис	Феназин-1-карбонова кислота Феназин-1-карбоксамід 2-гептил-4-гідроксихінолон	Moussa, Ebrahim, Kalscheuer, Liu, & Proksch, 2020
<i>Streptomyces rochei</i> MB037	<i>Rhinocladiella similis</i> 35	Солодовий екстракт, декстроза	Боррелідин J Боррелідин K 7-метокси-2,3-диметилхромон-4-он	Yu et al., 2019
<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34	<i>Aspergillus fumigatus</i> MR2012	Глюкоза	Бревіанамід X Лютеорид D Псевротін G	Wakefield, Hassan, Jaspars, Ebel, & Rateb, 2017
<i>Bacillus subtilis</i> CGMCC 13141	<i>Aspergillus sydowii</i> 401353	Декстроза	(7S)-10-гідроксидеканова кислота Сидонат серину Макролактин U'	Sun et al., 2021; Sun et al., 2022
<i>Streptomyces fradiae</i> 007	<i>Penicillium</i> sp. WC-29-5	Глюкоза, мальтоза, маніт	Дезоксифунікон Альтернаріол Вермістатин (9R,14S)-епокси-11-дезоксифунікон (9S,14R)-епокси-11-дезоксифунікон	Wang et al., 2014
<i>Streptomyces</i> sp. CMB-StM0423	<i>Aspergillus</i> sp. CMB-AsM0423	Крохмаль	Геронапірол B	Khalil, Cruz-Morales, Licon-Cassani, Marcellin, & Capon, 2019
<i>Streptomyces lividans</i> 66	<i>Verticillium dahliae</i>	Глюкоза	Ундецилпродигіозин	Meschke, Walter, & Schrempf, 2012
<i>Streptomyces</i> sp. SUK10	<i>Fusarium</i> sp. F7S15	Солодовий екстракт, моногідрат глюкози	Наразин D Семіноліпід Олігоміцин A Ікозалід A1 Ікозалід A3	Zawawi et al., 2022

<i>Acinetobacter johnsonii</i> B2	<i>Trichoderma</i> sp. 307	Рис	Мікросферопсисини В, С (3R, 7R)-7-гідрокси-де-О- метиллазіодиплодин (3R)-5-оксо-де-О- метиллазіодиплодин 3R)-7-оксо-де-О- метиллазіодиплодин	Zhang et al., 2017
			Ботріородін Н	Zhang et al., 2018

Отже, внесення грибного посівного матеріалу при спільному вирощуванні із бактерією продуцентом має здатність посилювати синтез ПАР (приблизно у 2 – 30 разів) і антибіотиків (приблизно у 1,5 – 78 разів), регулювати їх антимікробну дію, а також синтезувати метаболіти, не характерні для монокультури.

В основі підвищення синтезувальної здатності бактерій можуть лежати такі механізми:

- 1) посилене утворення попередників вторинних метаболітів шляхом розщеплення субстрату ферментами еукаріотичних мікроорганізмів;
- 2) активація специфічних генів вторинного метаболізму грибів, що замовчуються при «класичному» процесі культивування;
- 3) продукція грибами специфічних метаболітів, що стимулюють транскрипційну активацію мовчазного кластера біосинтетичних генів для біосинтезу антимікробних сполук;
- 4) активація системи захисту бактерій шляхом синтезу протигрибкових і кворум-чутливих молекул.

1.1.2. Синтез вторинних метаболітів бактеріями за наявності грибних індукторів

У доступних літературних джерелах наводиться інформація про попереднє внесення грибних індукторів у середовище культивування бактерій – продуцентів ПАР та антибіотиків. Переважаюча частина експериментів присвячена дослідженню впливу грибних індукторів на синтез

вторинних метаболітів бактеріями родів *Bacillus* (Fifani et al., 2022; Chen et al., 2021; Wang et al., 2021) і *Streptomyces* (Liu, Wang, Li, Zhang, & Meng, 2022; Liu, Wang, Zhang, & Qi, 2022; Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020; Shi, Tao, & Liu, 2018; Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013; Wang, Wei, Zhang, Zhang, & Gu, 2017; Sharma et al., 2017).

Поверхнево-активні речовини. У більшості випадків в якості грибних індукторів науковці використовують живі клітини (Liu, Wang, Li, Zhang, & Meng, 2022; Liu, Wang, Zhang, & Qi, 2022; Chen et al., 2021; Wang et al., 2021), а супернатант (Liu, Wang, Li, Zhang, & Meng, 2022; Liu, Wang, Zhang, & Qi, 2022; Fifani et al., 2022) та інактивовані клітини (Fifani et al., 2022) – рідше.

Було проведено дослідження щодо впливу грибного штаму *Trichoderma harzianum* IHEM5437 на продукцію ліпопептидів *B. velezensis* GA1 (Fifani et al., 2022). Середовище культивування було такого ж складу, як це описано раніше (Benoit et al., 2015) і містило як субстрат глюкозу. Біосинтез ПАР проводили протягом 48 год при 30 °C із додаванням до культури *B. velezensis* GA1 10% (об./об.) або 90% супернатанту *T. harzianum* IHEM5437 або 100 г автоклавованого міцелію (6-добової культури).

Було показано, що індукція грибним штамом не значною мірою, але впливає на підвищення концентрації ітуруну, фенгіцину та сурфактину, порівняно із бактеріальною монокультурою. Як виявили автори статті, посилення синтезу ліпопептиду пояснюється тим, що грибок *T. harzianum* IHEM5437 здатен до продукції амінокислот і білків (Callow, Ray, Kelbly, & Ju, 2016), які *B. velezensis* GA1 може використовувати в якості єдиного джерела азоту.

Синтез ліпопептидів було описано і в інших літературних джерелах (Liu, Wang, Li, Zhang, & Meng, 2022; Liu, Wang, Zhang, & Qi, 2022), наприклад, за використання як продуцента *Streptomyces bikiniensis* HD-087. Культивування бактерій із грибним індуктором *Magnaporthe oryzae* Guy11 (у кількості 0,1; 0,2 і 0,3 г живих клітин для одного варіанту та 1; 2 і 3 мл

супернатанту для іншого) здійснювали на середовищі, що містило 20 г/л глюкози протягом 4 діб при 28 °С (120 об/хв).

Науковцями зазначається, що у процесі індукції грибними клітинами швидше активується цикл трикарбонових кислот, в якому утворюється більша кількість таких відновлювальних еквівалентів як НАДН і ФАДН, а також АТФ і пірувату, які є важливими сполуками у біосинтезі жирних кислот. Синтез жирних кислот у мікробній клітині, у свою чергу, є ключовим етапом біосинтезу ліпопептидів. Встановили, що грибні клітини за оптимальних умов індукції не впливають на накопичення біомаси бактерією продуцентом. За внесення індуктора синтез ліпопептидів посилювався, тобто, концентрація ПАР у культуральній рідині була на 107,4% вищою, ніж концентрація відповідних ПАР у контрольному зразку.

У дослідженні (Chen et al., 2021) по спільному культивуванню *B. amyloliquefaciens* CX-20 із *A. oryzae* 92011, *A. niger* 93027, *Trametes* sp. 48424 (див. підрозділ 1.1.1) також проводили експеримент із попереднім внесенням еукаріотичних живих клітин у якості індуктора. Мікроорганізми культивували за умов росту на глюкозі та ріпаковому шроті протягом 72 год, за температури 28 °С та швидкості перемішування 220 об/хв. Концентрація одержаного таким чином ітуруину А була істотно меншою (у 2,5 – 5,3 рази), ніж відповідного ліпопептиду із використанням лише монокультури-продуцента.

Синтез ітуруину А за використання в якості продуценту *B. amyloliquefaciens* CX-20 також було описано у подальшому дослідженні (Wang et al., 2021). Культивування проводили за вищеописаними умовами (Chen et al., 2021) із попереднім внесенням таких індукторів як *A. oryzae* 92011 або *Trametes* sp. 48424. Однак для усунення недоліків одного із субстратів (ріпаковий шрот) було попередньо застосовано екстракцію фенольних сполук, що входять до його складу. Після внесення грибного індуктора та застосування екстракції ефективність синтезу ітуруину А зросла на 33 %.

Антибіотики. У літературних джерелах не наведено інформації щодо впливу інактивованих клітин грибних індукторів на синтез антибіотиків, однак зустрічаються дослідження, в яких описано негативний вплив (Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013; Wang, Wei, Zhang, Zhang, & Gu, 2017; Sharma et al., 2017) або позитивну динаміку (Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020; Shi, Tao, & Liu, 2018; Wang, Wei, Zhang, Zhang, & Gu, 2017) супернатанту та живих клітин індукторів на продукцію таких вторинних метаболітів.

Автори статті (Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020) зазначили, що при попередньому внесенні грибного індуктора *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* у середовище культивування *Streptomyces rimosus* M527 можливим є підвищення синтезу антибіотику римоцидину. Процес культивування здійснювали протягом 96 год при температурі 28 °C із постійним перемішуванням 180 об/хв та об'ємом посівного матеріалу 4% (об./об.) за використання соєвого борошна та D-маніту в якості субстрату.

Так, концентрація римоцидину за попереднього внесення індуктора у вигляді супернатанту та живих клітин значно підвищилася, порівняно із контролем, у 1,5 та 1,8 раз відповідно. Оскільки римоцидин виявляє високу біологічну активність проти *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Lu D. et al., 2016), посилена продукція антибіотика вказує на захисну реакцію *S. rimosus* M527 проти грибних клітин.

Описано достатньо широке коло досліджень по спільному культивуванню продуцентів натаміцину із різними штамми грибних індукторів (Shi, Tao, & Liu, 2018; Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013; Wang, Wei, Zhang, Zhang, & Gu, 2017). Було виявлено, що при попередньому внесенні супернатанту (5 %) *A. niger* і *Penicillium chrysogenum* у середовище культивування *Streptomyces natalus* N5, синтез антибіотику посилювався у 1,7 – 2 рази. Синтез антибіотику проходив за температури 28 °C, рН 7,2, часу культивування 4 доби (Shi, Tao, & Liu, 2018).

В інших літературних джерелах (Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013; Wang, Wei, Zhang, Zhang, & Gu, 2017) зазначається, що продуцентом натаміцину

було обрано *Streptomyces natalensis* HW-2. Було проведено дослідження (Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013) по культивуванню даних актиноміцетів із попереднім внесенням живих клітин (0; 5; 10; 20; 40; 60 мг/л) або супернатанту (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 %) таких грибних індукторів як *A. oryzae* AS 3.2068, *A. niger* AS 3.6472, *P. chrysogenum* AS 3.5163.

Результати показали, що при внесенні живих клітин (40 і 20 мг/л) або супернатанту (1,5 і 2 %) *A. niger* AS 3.6472 і *P. chrysogenum* AS 3.5163, синтез антибіотика посилюється в 1,3 – 3 рази. Також виявили, що живі клітини *A. oryzae* AS 3.2068 (10 мг/л) не впливають на продукцію натаміцину, а відповідний супернатант (2 %) пригнічує його синтез.

У подальшому дослідженні (Wang, Wei, Zhang, Zhang, & Gu, 2017) за використання вищеописаного продуцента, в якості індуктора було обрано супернатант *P. chrysogenum* AS 3.5163. Підготовку індуктора проводили шляхом вирощування відповідного грибного штаму протягом 48 год із подальшим пропусканням культуральної рідини через фільтрувальний папір (30 – 50 мкм). Одержаний фільтрат центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хв, а потім супернатант екстрагували етилацетатом. Етилацетат упарювали на роторному випарнику при 45 °С, а отриманий екстракт стерилізували через міліпористий фільтр 0,45 мкм.

Індуктор (6%, об./об.) вносили у середовище культивування *S. natalensis* HW-2 після 24 години від початку процесу ферментації. У контрольний зразок додавали 6% стерильної води (об./об.). Було виявлено, що при внесенні супернатанту *P. chrysogenum* AS 3.5163 концентрація одержаного натаміцину у культуральній рідині збільшується на 107,5 %, порівняно із контролем (без індуктора). Відомо, що оксалоацетат є важливим інтермедіатом для біосинтезу натаміцину (Aragiçio et al., 2016). Оскільки при додаванні пеніцилінів у якості індуктора, посилюється активність піруваткарбоксилази і фосфоенолпіруваткарбоксилази, а активність цитратсинтази знижується, то тим самим підвищується синтез натаміцину.

Авторами статті (Sharma et al., 2017) зазначається, що при внесенні у середовище культивування *Streptomyces lavendulae* ACR-DA1 живих клітин *Trichoderma velutinum* синтез антибіотику валіноміцину стрімко знижується. У такому досліді еукаріотичний індуктор готували вирощуванням гриба до стаціонарної фази, після чого міцелій двічі промивали стерильною дистильованою водою, а потім розтирали із рідким азотом.

Одержаний гомогенат двічі суспендували у стерильній дистильованій воді та стерилізували на фільтрі з діаметром пор 0,2 мкм. Після внесення індуктора (0,2%) у середовище культивування бактерії проводили процес біосинтезу за температури 10 °C протягом 8 діб. Концентрація валіноміцину була нижчою у 2 рази, порівняно із концентрацією відповідного антибіотику, синтезованого без участі індуктора.

Тому, можна зробити висновок, що за попереднього внесення клітин грибного індуктора у середовище культивування бактерії-продуцента постає можливість одержання ПАР та антибіотиків із вищою концентрацією у культуральній рідині. Синтез даних вторинних метаболітів суттєво залежить від фізіологічного стану індуктора, адже за використання саме інактивованих грибних клітин індукція майже не відбувається. Синтез антимікробних сполук також істотно залежить від концентрації таких індукторів у середовищі культивування.

Узагальнена інформація щодо впливу грибних індукторів на продукцію антимікробних метаболітів наведена у *табл. 1.3*.

Таблиця 1.3

Вплив еукаріотичних індукторів на синтез вторинних метаболітів бактерій-продуцентів

Продуцент	Індуктор	Фізіологічний стан індуктора	Субстрат	Концентрація вторинних метаболітів		Література
				Монокультура	Співкультура	
<i>Streptomyces bikiniensis</i> HD-087	<i>Magnaporthe oryzae</i> Guy11	Супернатант	Глюкоза	Ліпопептиди: 285,6 ± 9,3 мг/л	531,3 ± 9,3 мг/мл	Liu, Wang, Li, Zhang, & Meng, 2022
<i>Bacillus subtilis</i> RLID 12.1	<i>Candida albicans</i> SC 5314	Інактивовані клітини	Дріжджовий екстракт	Ліпопептиди AF ₃ : 920 мг/л; AF ₅ : 501 мг/л	Ліпопептиди AF ₃ : 1280 мг/л; AF ₅ : 960 мг/л	Ramchandran, Ramesh, Thakur, Chakrabarti, & Roy, 2020
<i>Streptomyces natalensis</i> HW-2	<i>Penicillium chrysogenum</i> AS 3.5163	Супернатант	Глюкоза	Натаміцин: 1,2 г/л	2,49 г/л	Wang, Wei, Zhang, Zhang, & Gu, 2017
<i>Streptomyces natalensis</i> HW-2	<i>Aspergillus oryzae</i> AS 3.2068	Живі клітини, супернатант	Глюкоза	Натаміцин: 0,639 г/л	0,639 г/л (живі клітини); 0,35 г/л (супернатант)	Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013
	<i>Aspergillus niger</i> AS 3.6472				0,799 г/л (живі клітини); 1,62 г/л (супернатант)	
	<i>Penicillium chrysogenum</i> AS 3.5163				0,875 г/л (живі клітини); 1,84 г/л (супернатант)	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AS 2.2081				0,639 г/л (живі клітини); 0,7 г/л (супернатант)	

Продовження табл. 1.3

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CX-20	<i>Aspergillus oryzae</i> 92011	Живі клітини	Глюкоза, ріпаковий шрот	Ітурин А: 1,74 г/л	1,88 г/л	Wang et al., 2021
	<i>Trametes</i> sp. 48424				1,95 г/л	
<i>Streptomyces natalus</i> N5	<i>Aspergillus niger</i>	Супернатант	Глюкоза, крохмаль	Натаміцин: 0,85 г/л	1,44 г/л	Shi, Tao, & Liu, 2018
	<i>Penicillium chrysogenum</i>				1,69 г/л	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				0,85 г/л	
<i>Streptomyces lavendulae</i> ACR-DA1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Живі клітини	Крохмаль	Валіноміцин: 50 мг/л	67 мг/л	Sharma et al., 2017
	<i>Trichoderma velutinum</i>				26,3 мг/л	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CX-20	<i>Aspergillus oryzae</i> 92011	Живі клітини	Глюкоза, ріпаковий шрот	Ітурин А: 1,25 г/л	0,37 г/л	Chen et al., 2021
	<i>Aspergillus niger</i> 93027				0,51 г/л	
	<i>Trametes</i> sp. 48424				0,24 г/л	
<i>Streptomyces rimosus</i> M527	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Супернатант, живі клітини, інактивовані клітини	Соєве борошно, D-маніт	Римоцидин: 0,21-0,22 г/л	0,36 г/л (супернатант); 0,3 г/л (живі клітини); 0,24 г/л (інактивовані клітини)	Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>				0,3 г/л (супернатант); 0,385 г/л (живі клітини); 0,22 г/л (інактивовані клітини)	

1.2. Дріжджі як регулятори синтезу та біологічної активності вторинних метаболітів

Поступово з'являються дослідження щодо впливу спільного культивування бактеріальних продуцентів вторинних метаболітів із дріжджами (Ariana, & Hamed, 2017; Wang, Miao, Qiao, Xu, & Cheng, 2022) або попереднього внесення відповідних еукаріотичних індукторів (Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020; Shi, Tao, & Liu, 2018).

У літературі наведено експериментальні дані щодо ефективного застосування конкурентних дріжджових мікроорганізмів на синтез ПАР (Wang, Miao, Qiao, Xu, & Cheng, 2022; Priya et al., 2015; Ramchandran, Ramesh, Thakur, Chakrabarti, & Roy, 2020) та їх антимікробної активності (Bai et al., 2022; Ramchandran, Ramesh, Thakur, Chakrabarti, & Roy, 2020), антибіотиків (Ariana, & Hamed, 2017; Sharma et al., 2017), а також інших вторинних метаболітів (Zhang et al., 2017).

1.2.1. Спільне культивування продуцентів практично цінних метаболітів з дріжджами

Поверхнево-активні речовини. У літературі представлено роботи (Bai et al., 2022; Wang, Miao, Qiao, Xu, & Cheng, 2022; Priya et al., 2015), у яких науковці визначали можливість спільного культивування бактерій-продуцентів ПАР із клітинами дріжджів. Як показали попередні дослідження (Ding, Guo, & Chen, 2019), при внесенні у середовище культивування *Bacillus amyloliquefaciens* Pс3 екзогенних жирних кислот підвищувалися концентрація ліпопептидів у культуральній рідині та подальша їх антимікробна активність.

Саме тому було проведено експеримент (Bai et al., 2022) щодо впливу дріжджових клітин *Yarrowia lipolytica* YL21, які синтезують C₁₄-C₁₈ жирні кислоти, на синтез ліпопептидів *Bacillus amyloliquefaciens* HM618. Після 120 год вирощування на середовищі із 20 г/л глюкози (із періодичним підживленням 20 г/л через 24, 36 і 48 год), виявили, що концентрації синтезованих фенгіцину, сурфактину та ітурину А штамів HM618 та YL21

збільшувались у 7,24, 12,13 та 3,23 рази порівняно з результатами монокультури штаму НМ618 (див табл. 1.1).

Для визначення антимікробної активності використовували тест-культури, описані у статтях раніше (Toral, Rodríguez, Béjar, & Sampedro, 2018; Wu et al., 2019), а саме *Botrytis cinerea* і *Rhizoctonia solani*. Було показано, що ліпопептиди, синтезовані співкультурою виявляли вищу антифунгальну активність, ніж синтезовані монокультурою.

Синтезувальна здатність бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* НМ618 також була описана і іншими дослідниками (Wang, Miao, Qiao, Xu, & Cheng, 2022), але вже за індукції генно-інженерними штамми *Pichia pastoris* GS115. Показали, що при спільному культивуванні даних мікроорганізмів на харчових відходах, посилюється синтез ліпопептидів. Так, концентрація фенгіцину у культуральній рідині при внесенні дріжджових клітин із амілазною та ліпазною активністю зростала у 7 і 2 рази відповідно, порівняно з продукцією ПАР бактеріальною монокультурою.

У літературі (Priya et al., 2015) зазначається, що для регуляції синтезу ПАР *Bacillus pumilus* TERI MS2 і *Bacillus licheniformis* TERI MS3 можливим є культивування даних бактеріальних штамів із дріжджами *Candida vishwanathii* TERI MS1. Під час вирощування на нафті (1% мас./об.) як це описувалось раніше (Simons et al., 2013; Sheppard et al., 2014) посилювався синтез ПАР, оскільки зменшувався поверхневий натяг співкультури до 26 мН/м, порівняно з 69 мН/м для бактерій роду *Bacillus* без додавання індуктора.

Невелика частина літератури присвячена дослідженню спільного культивування дріжджів, внаслідок чого відбувалася індукція синтезу ПАР. Як зазначають автори статті (Kamyabi, Nouri, & Moghimi, 2017) було проведено процес культивування дріжджів *Sarocladium* sp. і *Cryptococcus* sp. при 28 °С за використання 300 мг/л пірену в якості субстрату. Виявили, що за спільного культивування таких мікроорганізмів поверхневий натяг співкультури знижується до 31 мН/м, порівняно із дистильованою водою (69

мН/м) та монокультурами *Sarocladium* sp. і *Cryptococcus* sp. (34 і 33 мН/м, відповідно), що свідчить про підвищення продукції ПАР.

Антибіотики. Доволі мала кількість статей (Ariana, & Hamed, 2017) присвячена спільному культивуванню бактеріальних продуцентів антибіотиків із дріжджовими клітинами. Так, при спільному вирощуванні *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis* UTMC 106 із дріжджами *Yarrowia lipolytica* ATCC 18942 зростає кінцева концентрація нізину у культуральній рідині. Бактеріальний штам культивували протягом 12 годин, за 30 °С і 100 об/хв за використання сахарози в якості субстрату, а дріжджовий вирощували протягом 24 годин, за 30 °С і 160 об/хв на гліцерині. Вирощування співкультури (1:2; 1:1; 2:1) проводили на мелясі протягом 24 год.

Після завершення процесу біосинтезу культуральну рідину центрифугували, а одержаний супернатант змішували із сульфатом амонію (80 %). Таким чином, білок, що випав в осад, повторно центрифугували, а згодом розчиняли в сечовині. Одержаний розчин (100 мкл) завантажували у колонку (25 °С) системи ВЕРХ з УФ-детектором за використання води як рухомої фази. Виявили, що синтезувальна здатність співкультури мікроорганізмів 1:1 (бактерії : дріжджі) є вищою, порівняно із монокультурою *L. lactis* sub sp. *lactis* UTMC 106 на 53,4 %. Як припускають самі науковці, ріст бактерії після 18 год подовжується шляхом зниження рівня лактату шляхом його споживання *Y. lipolytica*. Таким чином рН підвищується і штам-продуцент підтримується в експоненціальній фазі більш тривалий час, що посилює вироблення нізину.

Інші антимікробні сполуки. Відомо, що спільне культивування бактеріальних продуцентів із дріжджовими конкурентними мікроорганізмами спричинює утворення і інших вторинних метаболітів з антимікробною дією (Zhang et al., 2017). Спільну культуру *Escherichia coli* і *Saccharomyces cerevisiae* вирощували у колбах, що містили як джерело вуглецю ксилозу (40 г/л), при 30 °С та частоті обертів мішалки 220 об/хв.

Культуральну рідину двічі екстрагували рівним об'ємом етилацетату з одержанням органічної фази, яку далі збирали та сушили потоком азоту, а залишок розчиняли в метанолі. Отримані екстракти аналізували шляхом пропускання через колонку ВЕРХ (30 °С) зі швидкістю потоку 0,2 мл/хв. Результати показали, що за використання співкультури продукція нарінгеніну незначною мірою, але зростає (на 6,1 %).

Із попередньо описаних літературних джерел можна зробити висновок, що спільне культивування дріжджів із бактеріальним або дріжджовим продуцентом на різноманітних субстратах істотно посилює синтез ПАР (у 2 – 12 разів), незначною мірою – антибіотиків (у 1,5 рази) та інших вторинних метаболітів (в 1,1 раз).

Узагальнені дані щодо впливу спільного вирощування бактерій із дріжджами на утворення вторинних метаболітів наведено у *табл. 1.1*.

1.2.2. Вплив дріжджових індукторів на синтез вторинних метаболітів бактеріями

У літературних джерелах наведено інформацію щодо впливу дріжджових індукторів на синтез вторинних метаболітів прокариотичними продуцентами. Більша частина такої інформації присвячена індукції синтезу антибіотиків (Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013; Shi, Tao, & Liu, 2018; Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020; Sharma et al., 2017), менша – поверхнево-активних речовин (Ramchandran, Ramesh, Thakur, Chakrabarti, & Roy, 2020).

Поверхнево-активні речовини. У широко доступній літературі наведено небагато інформації щодо впливу дріжджового індуктора на синтез ПАР. У статті (Ramchandran, Ramesh, Thakur, Chakrabarti, & Roy, 2020) зазначалося про вплив дріжджового індуктора *Candida albicans* SC 5314 на продукцію ліпопептидів бактерією *Bacillus subtilis* RLID 12.1. Культуру продуцента вирощували в оптимізованих умовах та середовищі із додаванням інактивованих нагріванням дріжджових клітин.

Виявили, що за попередньо внесеного індуктора у середовище культивування підвищується концентрація ліпопептидів AF₃ і AF₅ в 1,4 і 2

рази відповідно, порівняно із концентраціями ліпопептидів, одержаних без індуктора (табл. 1.3). Зокрема, одержані поверхнево-активні речовини проявляли високу антифунгальну дію проти дріжджів *Candida auris* (100 % інгібування) при МІК у діапазоні від 4 до 16 мкг/мл.

Антибіотики. У переважній частині досліджень зустрічається інформація щодо впливу різних дріжджових штамів *Saccharomyces cerevisiae* на синтез антибіотиків актиноміцетами роду *Streptomyces*. Зокрема, досліджується фізіологічний стан таких індукторів: живих (Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013; Sharma et al., 2017), інактивованих (Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020) клітин, або відповідного супернатанту (Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020; Shi, Tao, & Liu, 2018).

Дослідники (Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013) здійснювали вирощування продуценту *S. natalensis* HW-2 у колбах на качалках (180 об/хв) протягом 108 год при 28 °С. Індуктор *S. cerevisiae* AS 2.2081 вносили на початку процесу біосинтезу у вигляді живих клітин (0; 5; 10; 20; 40; 60 мг/л) або супернатанту (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 %). Виявили, що за попереднього внесення живих дріжджових клітин (10 мг/л) індукції синтезу натаміцину не відбувається, а відповідний супернатант (2,5 %) незначною мірою, але посилює продукцію такого антибіотика (на 10 %).

Також було проведено дослідження (Shi, Tao, & Liu, 2018) щодо впливу *S. cerevisiae* на синтез натаміцину за використання іншого продуцента – *S. natalus* N5. Попередню підготовку індуктора проводили шляхом культивування сахароміцетів при 28 °С та частоті обертів 150 об/хв, а потім пропусканням через 8 шарів марлі і висушуванням протягом 15 хв. Одержаний супернатант (5 %) вносили на початку біосинтезу у середовище культивування актиноміцетів, що містило глюкозу. Виявили, що за використання в якості індуктора *S. cerevisiae* підвищення або зниження синтезу натаміцину, порівняно із контролем, не відбувається.

Як це було показано науковцями (Song, Ma, Bechthold, & Yu, 2020), попереднє внесення дріжджового індуктора *S. cerevisiae* у середовище

культивування *S. rimosus* M527 може посилювати синтез і антибіотика римоцидину. Процес культивування здійснювали за умов, зазначених попередньо у підрозділі 1.1.2. Вирощування посівного матеріалу актиноміцету проходило так само, як це було описано раніше (Zhao, Lu, Bechthold, Ma, Yu, 2018).

Було показано, що концентрація антибіотику у культуральній рідині істотно залежить від фізіологічного способу підготовки індуктора. Так, концентрація римоцидину за попереднього внесення індуктора у вигляді супернатанту та живих клітин значно підвищилася на 64 і 36 % відповідно, порівняно із контролем (без внесення індуктора). Інактивовані клітини дріжджового індуктора майже не впливали на синтез римоцидину.

Науковцями (Sharma et al., 2017) було описано вплив дріжджового індуктора *S. cerevisiae* на синтез валіноміцину *S. lavendulae* ACR-DA1. Продуцент вирощували на середовищі із крохмалем у колбах на качалках (200 об/хв) за температури 10 °C протягом 8 діб і попереднього внесення живих клітин індуктора. Підготовку дріжджової культури здійснювали аналогічно грибній *Trichoderma velutinum* (див. підрозділ 1.1.2). Результати показали, що концентрація валіноміцину була вищою на 34 %, порівняно із концентрацією відповідного антибіотика у контрольному зразку (без внесення індуктора).

Отже, за попереднього внесення дріжджових індукторів у середовище культивування бактерій, можна підвищити продукцію поверхнево-активних речовин та антибіотиків. У дослідженнях різних фізіологічних станів таких індукторів, найвищий синтезувальний ефект спостерігається за використання саме живих клітин або супернатанту. Однак інактивовані дріжджові клітини також виступають ефективними агентами у посиленні синтезу ПАР в 1,4 – 2 рази.

Узагальнена інформація щодо впливу дріжджових індукторів на продукцію вторинних метаболітів наведена у *табл. 1.3*.

Мікробне спільне культивування є достатньо потужним інструментом для імітації природної мікробної спільноти та індукції синтезу специфічних або нових вторинних метаболітів, які не є характерними у вирощуванні культур незалежних штамів. Отже, після аналізу літературних джерел, що було узагальнено у таблицях 1.1 і 1.2, можна зробити висновок, що за використання еукаріотичних клітин при спільному культивуванні або в якості індуктора, продукція вторинних метаболітів у більшості випадків у незначній мірі, але зростає, порівняно із продукцією таких метаболітів лише бактерією-продуцентом.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти досліджень

Основний об'єкт досліджень – бактеріальний нафтоокиснювальний штам, виділений із забрудненого нафтою зразка, ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7241. Як біологічний індуктор використовували дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1.

Для визначення антимікробної та антиадгезивної активності ПАР, а також їх здатності у руйнуванні мікробних біоплівочок, в якості тест-культур використовували бактерії (*Staphylococcus aureus* БМС-1, *Enterobacter cloacae* С-8, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Bacillus subtilis* БТ-2) та дріжджі (*Candida albicans* Д-6 і *Candida tropicalis* РЕ-2) з колекції живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

2.2. Культивування продуцента поверхнево-активних речовин

Вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 здійснювали у рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35, NaCl – 1,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, вода дистильована – до 1 л, рН 6,8–7,0. У середовище також додатково вносять дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка), що містив (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; H_3BO_3 – 0,006; KI – 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) – 0,5.

					НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	Розділ 2. Матеріали і методи досліджень	Літера	Аркш	Аркшів
Розробник		Парфенюк М.А.						
Керівник		Пирог Т.П.					42	174
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стадніков В.П.						

Як джерело вуглецю використовували очищений гліцерин – 3%, відходи виробництва біодизелю – 5 % (об'ємна частка). Концентрації гліцерину різної якості еквімолярні за вуглецем. Посівний матеріал вирощували на базовому середовищі з 0,5 % відповідного субстрату.

2.3. Підготовка еукаріотичного індуктора

Дріжджі *S. cerevisiae* БТМ-1 вирощували упродовж 24 год на качалці (320 об/хв) в ідентичному для продуцента ПАР середовищі, що містило як джерело вуглецю глюкози (0,5 %). Після 24 год вирощування культуральну рідину розливали у стерильні епіндорфи та центрифугували (10000 g, 10 хв).

Одержаний супернатант використовували як індуктор і вносили з розрахунку 2,5 мл на 100 мл середовища культивування продуцента ПАР. Біомасу ресуспендували у стерильній водопровідній воді до об'єму, взятого для центрифугування. Ресуспендовану біомасу (живі клітини індуктори) вносили з розрахунку 2,5 мл суспензії на 100 мл середовища культивування продуцента ПАР. Частина ресуспендованої біомаси стерилізували в автоклаві при 131 °С упродовж 1 год для одержання інактивованих клітин (вносили з розрахунку 10 мл суспензії на 100 мл поживного середовища).

Внесення індуктора здійснювали на початку процесу культивування. Культивування штамів здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 7 діб.

Варіанти культивування:

1. Субстрат – очищений гліцерин (3 %):
 - 1.1. Контроль (без індуктора).
 - 1.2. Індуктор – живі клітини.
 - 1.3. Індуктор – інактивовані клітини.
 - 1.4. Індуктор – супернатант.
2. Субстрат – відходи виробництва біодизелю (5 %):
 - 2.1. Контроль (без індуктора).
 - 2.2. Індуктор – живі клітини.
 - 2.3. Індуктор – інактивовані клітини.

2.4. Індуктор – супернатант.

3. Субстрат – очищений гліцерин (3 %):

3.1. Контроль (без індуктора).

3.2. Індуктор – живі клітини.

4. Субстрат – відходи виробництва біодизелю (5 %):

4.1. Контроль (без індуктора).

4.2. Індуктор – живі клітини.

2.4. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин та одержання препаратів ПАР

Позаклітинні ПАР виділяли з супернатанту модифікованим методом Блайя і Дайера, як описано у роботі (Pirog, Kluchka, Skrotska, & Stabnikov, 2020). З метою одержання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g упродовж 20 хв. Оскільки *A. calcoaceticus* IMB V7241 синтезує комплекс полярних і неполярних ліпідів, а метод Блайя і Дайера (Bligh, & Dyer, 1959) дає змогу виділяти в основному неполярні ліпіди, модифікували класичну суміш Фолча (хлороформ і метанол, 2:1) додаванням до неї 1 н HCl (хлороформ–метанол–вода = 4:3:2). Описана система дозволяє максимально у повному обсязі виділяти як полярні, так і неполярні ліпіди.

У циліндричну ділильну лійку об'ємом 100 мл вносили 25 мл супернатанту, додавали 1 н розчин HCl для досягнення рН 4,0–4,5 (близько 5 мл), воронку закривали шліфованої пробкою і струшували 3 хв, потім додавали 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і струшували (екстрагування ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали в ділильній лійці для поділу фаз, після чого нижню фракцію зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції.

При повторній екстракції до водної фази додавали 1 н розчин HCl для досягнення рН 4,0–4,5 (близько 5 мл), 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і екстрагували ліпіди упродовж 5 хв. Після поділу фаз зливали нижню

фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і проводили екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1–3 об'єднували і випарювали на роторному випарнику IP-1M2 при 50 °C до постійної маси.

Під час досліджень як препарати використовували розчини поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B7241 різної концентрації (880 – 3080 мкг/мл). Для цього сухий залишок ПАР розчиняли в стерильному фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,0) до вихідного об'єму (25 мл) і далі розводили цим буфером до необхідної концентрації. Приготовані таким чином розчини ПАР стерилізували в автоклаві при 112 °C впродовж 30 хв.

2.5. Визначення антимікробної активності ПАР

Антимікробну активність поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), як описано у роботі (Pirog, Savenko, Shevchuk, Krutous, & Iutynska, 2016). Визначення МІК здійснювали шляхом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів. У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл розчину ПАР певної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку.

Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Таким чином, кінцевий об'єм у кожній пробірці становив 1 мл (МПБ чи сусло і розчин поверхнево-активних речовин), а концентрація ПАР у кожній наступній пробірці знижувалася у 2 рази. Як контроль використовували 1 мл МПБ (для бактерій) або рідкого сусла (для дріжджів) без внесення розчину ПАР. Далі у кожну з пробірок вносили по 0,1 мл суспензії бактеріальних та дріжджових тест-культур (10^5 – 10^6 КУО/мл) і перемішували.

Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28–30 °C для бактерій та 24–26 °C для дріжджів. Оцінку результатів проводили візуально за помутнінням

середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (активний ріст тест-культури), (-) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину поверхнево-активних речовин визначали як концентрацію ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній.

2.6. Дослідження впливу ПАР на ступінь деструкції біоплівки

Дослідження впливу ПАР на руйнування біоплівки здійснювали, як описано у роботі (Gomes, & Nitschke, 2011). Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл м'ясо-пептонного бульйону чи рідкого сусла та 20 мкл суспензії однодобової тест-культури, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культури температурі. Після цього культуральну рідину зливали і вносили 180 мкл свіжого МПБ (рідкого сусла) і 20 мкл суспензії тест-культури і повторно інкубували впродовж наступних 24 год.

Через 48 год культуральну рідину зливали, а в лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культури) вносили по 200 мкл препаратів ПАР різної концентрації (6,8-880 мкг/мл). У контрольні лунки замість препаратів ПАР вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води і визначали кількість адгезованих клітин спектрофотометричним методом. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

2.7. Визначення антиадгезивної активності ПАР

Визначення антиадгезивних властивостей ПАР здійснювали, як описано у роботі (Pirog, Konon, Beregovaya, & Shulyakova, 2014). Однакові пластинки (1 см²) досліджуваних матеріалів попередньо очищували мийним засобом, ополіскували дистильованою водою, висушували на повітрі та стерилізували (сталеві пластини, кахель – при 121 °С, пластик, лінолеум – при 112°С упродовж 30 хв). Після стерилізації абіотичні поверхні обробляли розчином ПАР (у контрольному варіанті – стерильним фосфатним буфером) та витримували при 30 °С протягом 18–24 год. Далі контрольні і попередньо

оброблені препаратами ПАР матеріали ополіскували стерильним фосфатним буфером або дистильованою водою для видалення залишку препаратів.

Тест-культури мікроорганізмів суспендували у 100 мл стерильної водопровідної води, у суспензію поміщали попередньо оброблені і не оброблені (контрольні) матеріали і витримували 2 год при 30 °С. Контрольні і попередньо оброблені матеріали ополіскували фосфатним буфером, щоб змити неадгезовані клітини. Матеріали з адгезованими на них клітинами залишали до висихання на повітрі, після чого адгезовані клітини фіксували, поміщаючи матеріал спочатку у метанол (99 %) на 15 хв і фарбували у 1 % розчині генціанвіолету 5 хв. Пластини матеріалу ополіскували водопровідною водою і залишали при кімнатній температурі до висихання. Далі адгезовані клітини з барвником змивали з поверхні матеріалів 1 мл льодової оцтової кислоти, вносили 9 мл дистильованої води і вимірювали оптичну густина отриманої суспензії на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм.

Кількість адгезованих клітин (ступінь адгезії) визначали спектрофотометричним методом як відношення оптичної густини суспензії, одержаної з оброблених препаратами ПАР матеріалів (кахель, сталь, лінолеум), до оптичної густини контрольних зразків (без обробки ПАР) і виражали у відсотках.

2.8. Визначення антимікробної активності ефірної олії, ПАР та їх суміші

Антимікробну дію ефірної олії, поверхнево-активних речовин та їх суміші аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), як описано у роботі (Pirog, Kliuchka, Kliuchka, Shevchuk, & Iutynska, 2020). Ефірні олії чайного дерева та кориці розчиняли в 5%-му етиловому спирті до концентрації 500 мкг/мл. Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій та у рідкому суслі (РС) для дріжджів. У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл антимікробної

речовини (ПАР, ефірна олія) певної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили в наступну пробірку.

Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Кінцевий об'єм у кожній пробірці становив 1 мл, а концентрація ПАР або ефірної олії у кожній наступній пробірці знижувалася вдвічі. Як контроль використовували 1 мл МПБ або РС без додавання розчину антимікробних речовин. Далі в кожен з пробірок вносили по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^5 – 10^6 КУО/мл) та перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28 – 30 °С для бактерій та 24–26 °С для дріжджів. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (-) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію ПАР, ефірної олії та їх суміші визначали як значення концентрації досліджуваних речовин у першій пробірці, де ріст був відсутній.

Для оцінки синергічної дії ПАР з ефірною олією використовували показник фракційної інгібуючої концентрації (ФІК) – сума відношення концентрації кожної речовини в суміші до їх мінімальної інгібуючої концентрації. Показник ФІК розраховували за формулою, зазначеною у роботі (Mohamed, Mohamed, Khalil, Azmy, & Mabrouk, 2018):

$$\Sigma = \text{ФІК} = (C_A / \text{МІК}_A) + (C_B / \text{МІК}_B),$$

де $C_{A,B}$ – концентрація антимікробної речовини в суміші; $\text{МІК}_{A,B}$ – мінімальна інгібуюча концентрація антимікробної речовини окремо.

Співвідношення препаратів у суміші становило 1:1, при цьому концентрація ПАР залишалася незмінною, а концентрацію ефірної олії знижували методом послідовних двократних розведень, в іншому варіанті концентрація ефірної олії залишалася незмінною, а концентрацію ПАР знижували як описано вище.

2.9. Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на ступінь деструкції біоплівки

Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на руйнування біоплівки здійснювали, як описано у роботі (Pirog, Kliuchka, Kliuchka, Shevchuk, & Iutynska, 2020). Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл м'ясо-пептонного бульйону чи рідкого суслу та 20 мкл суспензії однодобової тест-культури, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культури температурі. Після цього культуральну рідину зливали і вносили 180 мкл свіжого МПБ (рідкого суслу) і 20 мкл суспензії тест-культури і повторно інкубували впродовж наступних 24 год.

Через 48 год культуральну рідину зливали, а в лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культури) вносили по 200 мкл біоцидних препаратів різної концентрації (15,6 – 500 мкг/мл). Для дослідження синергізму використовувати препарати ПАР та ефірну олію у співвідношенні 1:1. У контрольні лунки замість препаратів вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води і визначали кількість адгезованих клітин спектрофотометричним методом. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР, ефірної олії або їх суміші лунках полістиролового планшета.

2.10. Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на ступінь деструкції двовидових біоплівок, що складаються з двох бактерій

Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на руйнування бактеріальних двовидових біоплівок здійснювали, як описано у роботах (Кухтин, Перкій, & Крушельницька, 2013; Шинкарук, Кухтин, Вічко, Швед, & Марінцова, 2018) із модифікацією. Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл м'ясо-пептонного бульйону та 20 мкл суспензії суміші однодобових тест-культур бактерій, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культур температурі, після чого

зливали культуральну рідину і вносили 180 мкл свіжого МПБ і 20 мкл суспензії суміші тест-культур і ще інкубували впродовж наступних 24 год. Через 48 год культуральну рідину зливали, лунки тричі промивали від планктонних (неприкріплених) клітин стерильною водопровідною водою та висушували їх.

В лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культур) вносили по 200 мкл препаратів ПАР, ефірної олії чайного дерева та їх суміші різної концентрації (15,6 – 500 мкг/мл). У контрольні варіанти (лунки) замість препаратів вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл).

Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл стерильною водопровідною водою. Лунки мікропланшета висушували, та фіксували протягом 10 хв метанолом та фарбували 0,1 % розчином кристалічного фіолетового. Потім ще раз промивали стерильною водопровідною водою, далі висушували та змивали з поверхні лунок 200 мкл 33%-ої оцтової кислоти, вносили 1,8 мл дистильованої води і вимірювали оптичну густину отриманої суспензії на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

2.11. Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на ступінь деструкції двовидових біоплівок, що складаються з бактерій і дріжджів

Дослідження впливу ефірної олії, ПАР та їх суміші на руйнування бактеріально-дріжджових двовидових біоплівок здійснювали, як описано у роботах (Ceresa et al., 2021; Galdiero et al., 2021) із модифікацією. Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл (90 мкл рідкого сусла та 90 мкл м'ясо-пептонного бульйону) та 20 мкл суспензії суміші однодобових тест-культур бактерій та дріжджів, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культур температурі, після чого зливали культуральну рідину і вносили 180 мкл свіжого МПБ (90 мкл рідкого сусла та 90 мкл м'ясо-пептонного бульйону) і 20 мкл суспензії суміші тест-культур і

ще інкубували впродовж наступних 24 год. Через 48 год культуральну рідину зливали, лунки тричі промивали від планктонних (неприкріплених) клітин стерильною водопровідною водою та висушували їх.

В лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культур) вносили по 200 мкл препаратів ПАР, ефірної олії чайного дерева та їх суміші різної концентрації (15,6-500 мкг/мл). У контрольні варіанти (лунки) замість препаратів вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл).

Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл стерильною водопровідною водою. Лунки мікропланшета висушували, та фіксували протягом 10 хв метанолом та фарбували 0,1 % розчином кристалічного фіолетового. Потім ще раз промивали стерильною водопровідною водою, далі висушували та змивали з поверхні лунок 200 мкл 33%-ої оцтової кислоти, вносили 1,8 мл дистильованої води і вимірювали оптичну густину отриманої суспензії на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

Усі досліді здійснювали у трикратних повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано у роботах (Pirog, Shulyakova, Sofilkanych, Shevchuk, & Mashchenko, 2015; Пирог, Шевчук, Петренко, Палійчук, & Іутинська, 2018). Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості $p < 0,05$.

**РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241,
СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
БТМ-1**

Спільне культивування, що передбачає вирощування двох або більше мікроорганізмів в одному обмеженому середовищі (Wakefield et al., 2017), можна вважати експериментальною імітацією у лабораторному масштабі природної конкуренції у мікробних спільнотах. Така конкуренція сприяє підвищенню синтезу вторинних метаболітів, наприклад, через сигнальні молекули (молекули авторегуляції/чутливості до кворуму, сидерофори тощо) (Bertrand, Bohni, Schnee, Schumpp, Gindro, & Wolfender, 2014; Marmann, Aly, Lin, Wang, & Proksch, 2014).

Серед співкультур найбільш поширеними є бактерії/гриби, в яких бактерія є штамом-індуктором (Li, Zhou, Guo, & Wang, 2021), і гриби/бактерії, в яких гриб продукує індуквані метаболіти (Maimone, de Oliveira, Santos, & de Lira, 2021). Однак, дослідження мікробних спільних культур дозволили використовувати більше двох мікроорганізмів в одній системі. Так, *Chevrette* з колегами виявили, що активність певних кластерів біосинтетичних генів відрізняються між монокультурами, подвійним культивуванням і тристороннім консорціумом, і що динаміка синтезу сполук залежить від міжвидових взаємодій і видового складу співтовариства мікроорганізмів (Chevrette et al., 2022).

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Парфенюк М.А.</i>				<i>Розділ 3. Біологічна активність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B- 7241, синтезованих за наявності <i>Saccharomyces cerevisiae</i> БТМ-1</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркиш</i>	<i>Аркишів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>						52	130
<i>Н. контр</i>								52
<i>Консульт</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Усе частіше з'являються роботи щодо дослідження спільного культивування, в результаті якого спостерігається індукція експресії мовчазних генів, синтез нових біологічно активних компонентів (Maglangit et al., 2020; Alves, Sequeira, & Cunha, 2019), посилення продукції бажаних метаболітів (DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018), а також можливість регуляції біологічної активності одержаних продуктів (Haque, Rahman, Haque, Sarker, Islam, 2016; da Silva, de Souza de Azevedo, Converti, de Souza Oliveira, 2022).

Зважаючи на дані, наведені у широкодоступній літературі, припустили, що попереднє внесення біологічного індуктора дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1 у середовище культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 буде супроводжуватися синтезом ПАР із посиленою біологічною активністю, а саме антимікробною та антиадгезивною активністю і деструкцією біоплівки.

3.1. Вплив дріжджового індуктора на антимікробну активність поверхнево-активних речовин

На першому етапі було проведено дослідження щодо впливу фізіологічного стану індуктора на можливість регуляції антимікробної активності ПАР, одержаних штамом ІМВ В-7241, за умов вирощування на гліцерині різної якості. Так, у *табл. 3.1* наведено одержані показники антибактеріальної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В7241 за наявності дріжджового індуктора різного способу підготовки.

Встановили, що незалежно від фізіологічного стану індуктора (живі, інактивовані клітини, супернатант), синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за їх наявності поверхнево-активні речовини виявилися ефективними антимікробними агентами щодо бактеріальних тест-культур. Виявили, що найефективнішим із використовуваних під час експерименту індуктором є живі клітини *S. cerevisiae* БТМ-1. Попереднє внесення таких клітин у середовище із очищеним гліцерином або відходами виробництва біодизелю

супроводжувалося утворенням поверхнево-активних речовин, МІК яких щодо досліджуваних тест-культур (*Enterobacter cloacae* С-8, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Bacillus subtilis* БТ-2 (спори), *Proteus vulgaris* ПА-12) були у 9 – 81 раз нижчими, порівняно зі значеннями мінімальної інгібуючої концентрації ПАР, одержаних без індуктора.

Зазначимо, що за наявності дріжджового супернатанту у середовищі культивування штаму ІМВ В-7241 із обома субстратами, було одержано ПАР, значення МІК яких були у 5 – 57 разів нижчими, ніж показники, встановлені для ПАР, утворених у середовищі без участі біологічного індуктора. Серед досліджуваних індукторів найменш ефективними виявилися інактивовані клітини дріжджів: антимикробна дія поверхнево-активних речовин, синтезованих за їх внесення, щодо більшості бактеріальних тест-культур була у 3 – 33 рази нижчою, ніж ПАР, одержаних без індуктора (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив дріжджів *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на антибактеріальну активність синтезованих ПАР

Субстрат для синтезу ПАР	Фізіологічний стан індуктора	Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР (мкг/мл) щодо			
		<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)
Очищений гліцерин (3%)	Контроль (без індуктора)	31,3	62,7	31,3	125
	Супернатант	5,9	5,9	2,9	11,8
	Живі клітини	3,4	1,7	0,85	3,4
	Інактивовані клітини	9,6	9,6	4,8	19,2
Технічний гліцерин (5%)	Контроль (без індуктора)	42,5	85	85	340
	Супернатант	1,5	6,0	3,0	6,0
	Живі клітини	1,05	2,1	2,1	4,2
	Інактивовані клітини	5,2	10,4	5,2	10,4

Примітка. Під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %.

Узагальнені результати про антимікробну активність ПАР, одержаних за наявності біологічного індуктора, щодо дріжджів роду *Candida* наведено у табл. 3.2. Представлені дані засвідчують, що найвища антифунгальна активність властива ПАР, синтезованим за попереднього внесення живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1. Показники мінімальної інгібуючої концентрації таких ПАР були у 37 – 162 рази нижчими, ніж МІК поверхнево-активних речовин, одержаних без індуктора. Найменш ефективними серед використовуваних індукторів виявилися інактивовані дріжджові клітини (МІК 2,4 – 10,4 мкг/мл).

Таблиця 3.2

Антифунгальна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності дріжджів *S. cerevisiae* БТМ-1

Субстрат для синтезу ПАР	Фізіологічний стан індуктора	Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР (мкг/мл) щодо	
		<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	125	62,7
	Супернатант	2,9	1,7
	Живі клітини	3,4	0,85
	Інактивовані клітини	9,6	2,4
Технічний гліцерин	Контроль (без індуктора)	170	85
	Супернатант	6,0	3,0
	Живі клітини	1,05	1,05
	Інактивовані клітини	10,4	2,6

Примітка. Під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %.

У доступній літературі переважна частина досліджень стосуються впливу еукаріотичного індуктора саме на синтез антимікробних сполук, лише у поодиноких роботах зустрічається інформація щодо впливу на активність одержаних метаболітів.

В експериментах в якості індукторів переважно використовують живі клітини мікроорганізмів (Luti, & Yonis, 2013; Luti, Yonis, & Mahmoud, 2018; Nurulita et al., 2020; Rateb et al., 2013), рідше – термічно інактивовані або

автоклавовані (Luti, & Yonis, 2013; Ramchandran, Ramesh, Thakur, Chakrabarti, & Roy, 2020) і дуже рідко – супернатант (Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013) після вирощування конкурентних мікроорганізмів. Слід зазначити, що дані з наукових джерел щодо ефективності використання живих, інактивованих клітин або відповідного супернатанту як індукторів суттєво відрізняються.

У дослідженні (Luti, & Yonis, 2013) було показано, що незалежно від типу індуктору (живі, чи інактивовані клітини) *Saccharomyces cerevisiae* концентрація феназину *Pseudomonas aeruginosa* активно зростала. Так, за дії живих або інактивованих клітин *S. cerevisiae* концентрація метаболіту складала 14,46 або 29,8 мг/л відповідно, що було вищим, порівняно із синтезувальною здатністю монокультури (7,6 мг/л). У той же час, у дослідженні (Luti, Yonis, & Mahmoud, 2018) внесення живих клітин *S. cerevisiae* призвело до вищого у 1,5 і 2,4 рази синтезу продигіозину *Serratia marcescens*, ніж за використання інактивованих клітин такого індуктора та навіть його відсутності у середовищі відповідно. Науковцям (Wang, Yuan, Gu, & Shi, 2013) вдалося підвищити синтез антибіотику натаміцину *Streptomyces natalensis* HW-2 додаванням супернатанту *Penicillium chrysogenum* AS 3.5163, *Aspergillus niger* AS 3.6472 та *Saccharomyces cerevisiae* AS 2.2081 до 1,84; 1,62 і 0,7 г/л, що було вищим, ніж при внесенні живих клітин відповідних індукторів (0,875; 0,799 і 0,639 г/л).

Чимало досліджень присвячено впливу бактеріальних індукторів на синтез та біологічну активність антимікробних сполук (Luti, & Yonis, 2013; Luti, Yonis, & Mahmoud, 2018; Rateb et al., 2013; Nurulita et al., 2020). В експерименті (Luti, & Yonis, 2013) зазначається також про використання в якості індукторів *Escherichia coli* і *Bacillus subtilis*. Так, за дії живих бактеріальних клітин вдалося одержати феназин концентрацією 18,8 і 13,83 мг/л відповідно, та за дії інактивованих клітин – 13,46 і 19,36 мг/л.

Науковці (Rateb et al., 2013) встановили, що використання супернатанту *Streptomyces bullii* C2 не спричинило ефекту на синтез антимікробних сполук грибом *Aspergillus fumigatus* MBC-F1-10, на відміну

від живих клітин індуктора, за додавання котрого синтезувалося дев'ять нових антимікробних метаболітів. Відомо також, що при внесенні *S. aureus* в якості живого індуктора зростала антимікробна активність екстрактів антибіотиків *Penicillium* sp. LBKURCC34 (Nurulita et al., 2020). Мінімальні інгібуючі концентрації таких антибіотичних екстрактів щодо *E. coli* ATCC35218 і *S. aureus* ATCC29213 складали 500 мкг/мл, що у 8 разів нижче ніж МІК екстрактів, одержаних за відсутності біологічного індуктора.

У доступних літературних джерелах відсутня інформація щодо впливу еукаріотичних клітин на біологічну активність поверхнево-активних речовин, однак є дані, що стосуються впливу бактеріальних індукторів. Так, у роботі (Пирог, Іванов, & Ярова, 2020) було встановлено, що за умови внесення біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2 (живих клітин) у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезуються поверхнево-активні речовини із найвищою антимікробною активністю. МІК за дії таких поверхнево-активних речовин щодо бактеріальних і дріжджових тест-культур були у 5 – 20 разів нижчими. Також спостерігали, що супернатант майже не впливав на антифунгальну активність ПАР щодо дріжджів роду *Candida*.

Дослідники (Pirog, Kliuchka, & Kliuchka, 2022) встановили, що при вирощуванні *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 з інактивованими клітинами *Escherichia coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 зростає антимікробна активність одержаних ПАР. Показник МІК під впливом поверхнево-активних речовин, синтезованих за участі індукторів, щодо усіх бактеріальних тест-культур (*E. coli* ІЕМ-1, *S. aureus* БМС-1 і *B. subtilis* БТ-2) був у 8 – 32 рази нижчим, ніж за дії препаратів ПАР, одержаних без індуктора.

Науковцями (Пирог, Никитюк, Макієнко, Шевчук, & Іутинська, 2017) було показано, що за присутності живих або інактивованих клітин *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 (вегетативних або спорових) у середовищі для вирощування *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, відбувається синтез ПАР із вищою антибактеріальною та антифунгальною активністю. МІК поверхнево-

активних речовин, одержаних під впливом таких бактеріальних індукторів щодо досліджуваних тест-культур був у 2 – 13 разів нижчим, ніж ПАР, синтезованих без індуктора. Також варто зазначити, що ПАР, синтезовані за наявності живих клітин, виявилися більш ефективними (6 – 30 мкг/мл), ніж такі антимікробні сполуки, синтезовані під дією інактивованого індуктора (12 – 50 мкг/мл).

Отже, отримані результати засвідчують, що внесення біологічного індуктора у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 посилює антибактеріальну та антифунгальну активність синтезованих ПАР у 5 – 162 рази. Зокрема, ефективність поверхнево-активних речовин зростає у присутності саме живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, що пояснюється потребою індукції у біологічній взаємодії між продуцентом ПАР і конкурентним мікроорганізмом.

3.2. Деструкція біоплівок поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності індуктора

В основі механізмів деструкції біоплівок під впливом мікробних поверхнево-активних речовин є їх антимікробна активність (Sharma, Misba, & Khan, 2019). Тому далі продовжували дослідження здатності до деструкції мікробних біоплівок поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В7241, синтезованих за попереднього внесення дріжджового індуктора у середовище із гліцерином різного ступеня очистки.

Так, у *табл. 3.3 – 3.7* представлено узагальнені дані щодо деструкції бактеріальних та дріжджових біоплівок за дії ПАР, одержаних за попереднього внесення клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із гліцерином різного ступеня очищення.

Встановлено, що найефективнішими щодо більшості досліджуваних тест-культур виявилися ПАР, одержані за наявності живих дріжджових клітин у середовищі культивування як із очищеним гліцерином, так і з відходами виробництва біодизелю. Так, наприклад, ступінь деструкції

біоплівки за дії ПАР (55 мкг/мл), утворених на очищеному гліцерині за наявності живих клітин індуктора, щодо бактерій (*E. cloacae* С-8, *S. aureus* БМС-1, *B. subtilis* БТ-2 (спори), *P. vulgaris* ПА-12) та дріжджів (*C. tropicalis* РЕ-2, *C. albicans* Д-6) становив 35,9-85% та 30-50,3% відповідно і був вищим у 1,25-3,5 разів, порівняно з використанням поверхнево-активних речовин аналогічної концентрації, утворених без індуктора (табл. 3.3 – 3.7).

Аналогічні закономірності руйнування як бактеріальних, так і дріжджових біоплівок, спостерігали і за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовищі із відходами виробництва біодизелю. При цьому ступінь деструкції біоплівок досліджуваних тест-культур за дії таких ПАР був у 1,5-3,8 разів вищим, ніж встановлений для поверхнево-активних речовин, одержаних за відсутності індуктора (табл. 3.3 – 3.7).

Встановлено, що внесення у середовище як з очищеним гліцерином, так і відходами виробництва біодизелю живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 і відповідного супернатанту супроводжувалося синтезом поверхнево-активних речовин, які у всьому досліджуваному діапазоні концентрацій (6,8-880 мкг/мл) ефективніше руйнували біоплівку *E. cloacae* С-8, ніж препарати, одержані у середовищі без індуктора. Так, деструкція цієї біоплівки під впливом ПАР, утворених за наявності у середовищі з обома субстратами живих клітин дріжджів та супернатанту була в середньому на 15-30 і 5-30 % відповідно вищою порівняно з показниками, встановленими для препаратів, синтезованих без індуктора. Зазначимо, що інактивовані дріжджові клітини виявився менш ефективним індуктором, ніж живі або супернатант. Деструкція біоплівки *E. cloacae* С-8 під впливом ПАР, одержаних за наявності інактивованих клітин у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення була, по-перше, в середньому всього на 3-12 % вищою, ніж після обробки препаратами, синтезованими без індуктора, а по-друге, така закономірність спостерігалася лише за певних з досліджуваних концентрацій ПАР (наприклад, 6,8-27,5 мкг/мл) (табл. 3.3).

Наявність живих дріжджових клітин та супернатанту у середовищі культивування продуцента із відходами виробництва біодизелю сприяло отриманню ПАР з найвищою здатністю до руйнування біоплівки *S. aureus* БМС-1 в широкому діапазоні концентрацій (6,8 – 880 мкг/мл). Так, ступінь деструкції під дією препаратів ПАР, одержаних за наявності живих клітин або супернатанту, був вищим на 6,6 – 44,3% та 4 – 44,3% відповідно, ніж руйнування біоплівки за дії препаратів, синтезованих без індуктора. У той же час ПАР (6,8 – 880 мкг/мл) отримані на очищеному гліцерині були ефективними антибіоплівковими агентами лише за наявності живих клітин індуктора. Ступінь руйнування під дією таких препаратів ПАР був вищим на 4,2 – 30%, ніж деструкція біоплівки за дії ПАР, утворених без індуктора. Зауважимо, що за низьких концентрацій ПАР 27,5-220 мкг/мл, ефективним індуктором був також супернатант, за наявності котрого у середовищі з очищеним гліцерином, одержані препарати руйнували біоплівку тест-культури на 10 – 21,7% краще, порівняно із поверхнево-активними речовинами, одержаними за відсутності *S. cerevisiae* БТМ-1. Порівняно із використанням живих клітин або супернатанту, найменш ефективним індуктором виявилися інактивовані клітини *S. cerevisiae* БТМ-1. Препарати ПАР (13,7 – 27,5 мкг/мл), утворені на гліцерині різної якості за дії такого індуктора збільшували руйнування біоплівки *S. aureus* БМС-1 лише на 4 – 8,3%, порівняно із поверхнево-активними речовинами, синтезованими без індуктора (табл. 3.4).

**Руйнування біоплівки *Enterobacter cloacae* С-8 за дії ПАР, синтезованих
A. calcoaceticus ІМВ В-7241 за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1**

Субстрат	Фізіологічний стан індуктора	Ступінь деструкції біоплівки (%) за дії ПАР концентрацією (мкг/мл)							
		880	440	220	110	55	27,5	13,7	6,8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	52,5	53,9	47,7	43,8	41	39,2	27,3	23
	Супернатант	60,9	62,9	76,5	73,5	60,1	50,4	42,1	28,3
	Живі клітини	76,4	71,5	79,6	66,0	60	60,2	50	38
	Інактивовані клітини	60,9	58,8	50	42,3	39,4	40,6	35,3	35,3
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	62,2	54,6	45,8	43	38,2	31,2	21,2	15,6
	Супернатант	84,1	82,2	62,3	64,1	57	43,5	36,5	31,3
	Живі клітини	81,1	70,5	68,2	59,5	54,2	52,9	38,2	33,7
	Інактивовані клітини	55,8	54,1	53,5	48,8	50	38,8	32,9	29,4

Примітка. Табл. 3.3 – 3.7: під час визначення ступеня деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5%.

За використання препаратів ПАР (6,8 – 880 мкг/мл), синтезованих за внесення живих дріжджових клітин або супернатанту у середовище як з очищеним гліцерином, так і відходами виробництва біодизелю, спостерігали найвищий ступінь руйнування біоплівок *B. subtilis* БТ-2. Деструкція біоплівки тест-культури за використання таких препаратів ПАР була вищою у середньому на 9,8 – 38,5 та 4 – 34,2% відповідно, порівняно із дією ПАР, одержаних без внесення індукторів. Зазначимо, що за високих концентрацій ПАР (220 – 880 мкг/мл) та наявності інактивованих клітин у середовищі із відходами виробництва біодизелю, ПАР краще руйнували біоплівки *B. subtilis* БТ-2, ніж препарати, синтезовані за відсутності індуктора, на 18,6 – 23,8%, а за оброки препаратами ПАР, що утворені за дії супернатанту показники деструкції біоплівки були на 3,3 – 8,1% вищими (табл. 3.5).

Вплив індуктора у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на здатність синтезованих руйнувати біоплівку *Staphylococcus aureus* БМС-1

Субстрат	Фізіологічний стан індуктора	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР концентрацією (мкг/мл)							
		880	440	220	110	55	27,5	13,7	6,8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	85,8	85,7	60	56,7	46,7	33,3	33,3	15
	Супернатант	75	79	71,7	66,7	60	55,0	30,1	16,7
	Живі клітини	98,2	90	90	85,0	67,4	60,0	37,5	20,0
	Інактивовані клітини	55,4	56,6	50	49,1	44,2	40,2	40	20,2
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	65,5	55,7	52,3	52,2	45,8	36,7	36,0	26,7
	Супернатант	100	100	83,4	80,7	66,1	46,2	40	34,5
	Живі клітини	99,5	100	84,5	70,1	70	51,4	44,2	33,3
	Інактивовані клітини	60	57,5	50	53,8	50	45	40	17,8

Встановлено, що поверхнево-активні речовини, одержані на гліцерині різної якості за наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, виявилися найефективнішими агентами у руйнуванні біоплівок *P. vulgaris* ПА-12 у всьому досліджуваному діапазоні концентрацій. Так, ступінь деструкції біоплівок за дії ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині або відходах виробництва біодизелю був вищим у середньому на 2 – 18,1%, ніж відповідний показник, встановлений для препаратів ПАР, одержаних без індуктора. Супернатант виявився менш ефективним індуктором, ніж живі клітини. Деструкція біоплівки *P. vulgaris* ПА-12 під впливом ПАР, одержаних за наявності супернатанту у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення була, в середньому на 2-11,1 % вищою, ніж після обробки препаратами, синтезованими без індуктора, проте лише за низьких концентрацій ПАР (6,8-55 мкг/мл). Ефективність інактивованих клітин індуктора спостерігали лише за використання окремих концентрацій ПАР (6,8; 27,5; 110 мкг/мл), одержаних на відходах виробництва біодизелю. Деструкція біоплівки *P. vulgaris* ПА-12 за дії таких поверхнево-активних

речовин була вищою на 1,6 – 2,5%, ніж під впливом ПАР, синтезованих без індуктора (табл. 3.6).

Таблиця 3.5

Вплив ПАР, синтезованих за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1, на деструкцію біоплівки *Bacillus subtilis* БТ-2

Субстрат	Фізіологічний стан індуктора	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР концентрацією (мкг/мл)							
		880	440	220	110	55	27,5	13,7	6,8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	70,7	63,3	66,7	53,8	33,8	24	26,1	13,2
	Супернатант	н. в.	70	75	73,8	63,8	58,2	н. в.	25
	Живі клітини	100	100	80,6	81,4	70,8	55,2	35,9	25,4
	Інактивовані клітини	75	75	55	60	48,2	38,2	30	30
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	61,4	57,6	46,2	48,9	40,4	31,9	23,3	16,9
	Супернатант	76,7	76,7	61,9	61,4	62,5	50,9	32,1	20,9
	Живі клітини	89,2	88,3	78,9	70,2	78,9	68,2	60,1	45,4
	Інактивовані клітини	80	81,2	70	60	50,4	40,6	37,2	19,4

Примітка. «н. в.» – не визначали.

Найвищий ступінь деструкції біоплівки *Candida tropicalis* PE-2 за обробки ПАР (6,8 – 880 мкг/мл), одержаних на відходах виробництва біодизелю спостерігався за наявності живих клітин індуктора та відповідного супернатанту. Так, ступінь деструкції біоплівки за дії ПАР, синтезованих із живими клітинами або супернатантом *S. cerevisiae* БТМ-1 був вищим на 8 – 50%, ніж за обробки ПАР, утворених без внесення індуктора. Заміна субстрату на очищений гліцерин викликало синтез ПАР із меншою здатністю до руйнування біоплівок. Такі поверхнево-активні речовини (6,8 – 440 мкг/мл) руйнували дріжджові біоплівки на 0,3 – 25,3% вище, ніж препарати ПАР, одержані без індуктора. Препарати ПАР, синтезовані за наявності інактивованих дріжджових клітин на гліцерині різної якості, ефективно руйнували біоплівки PE-2 лише за низьких концентрацій. Так, деструкція біоплівок за дії таких ПАР, одержаних на очищеному гліцерині (6,8 – 13,7 мкг/мл) або відходах виробництва біодизелю (13,7 – 27,5 мкг/мл) була вищою

на 8,1 – 12 або 1,8 – 3,2%, порівняно із одержаними без індукторів препаратами ПАР (табл. 3.7).

Таблиця 3.6

Ступінь деструкції біоплівки *Proteus vulgaris* ПА-12 за дії ПАР, синтезованих під впливом дріжджового індуктора

Субстрат для синтезу ПАР	Фізіологічний стан індуктора	Ступінь деструкції біоплівки (%) за дії ПАР концентрацією (мкг/мл)							
		880	440	220	110	55	27,5	13,7	6,8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	55,2	50,5	48,2	41,2	39,8	25,6	20,5	17,4
	Супернатант	60,9	52,9	55,5	46,7	41,7	35,9	27,4	23,2
	Живі клітини	69,4	68,6	64,7	53,6	55,1	42,4	32,8	29,3
	Інактивовані клітини	54	50,5	45,1	41,3	38,2	20,2	17,4	13,6
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	61,7	59,4	51,7	42,7	33,2	27,4	17,1	14,7
	Супернатант	62,4	58,6	56,4	42,5	42,1	32,9	28,2	24,7
	Живі клітини	71,7	64,3	67,8	59	46,7	45,5	25,9	16,7
	Інактивовані клітини	57	52,9	40	45,2	30,9	29	16,7	15,5

Встановлено, що найвищий ступінь руйнування біоплівки *Candida albicans* Д-6 досягався за наявності живих клітин дріжджового індуктора або супернатанту при синтезі ПАР на відходах виробництва біодизелю. Так, за обробки препаратів ПАР ступінь руйнування біоплівки *C. albicans* Д-6 був в середньому на 2,7 – 37,1% вищим, ніж під впливом поверхнево-активних речовин, одержаних без індуктора. Зазначимо, що ПАР на очищеному гліцерині ефективно руйнували біоплівку лише за наявності живих клітин індуктора так і за низьких концентрацій препаратів (6,8 – 220 мкг/мл). Так, відповідні ПАР збільшували ступінь деструкції біоплівки на 0,5 – 10,8% порівняно із значеннями, встановленими для ПАР синтезованих без індуктора. Поверхнево-активні речовини, синтезовані на відходах виробництва біодизелю за наявності інактивованих клітин, також активно руйнували біоплівку дріжджів. Так, ступінь деструкції біоплівки за дії таких препаратів ПАР (6,8 – 220 мкг/мл) була на 0,8 – 11,8% вищою порівняно із впливом ПАР, утворених без індуктора *S. cerevisiae* БТМ-1 (табл. 3.7).

Отже, як показали одержані результати досліджень (табл. 3.3 – 3.7), попереднє внесення дріжджового індуктора *S. cerevisiae* БТМ-1 у вигляді живих або інактивованих клітин чи відповідного супернатанту у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із гліцерином різної якості супроводжується активним посиленням біологічної активності синтезованих ПАР, що позитивно впливає на їх здатність до руйнування бактеріальних і дріжджових біоплівки.

Серед літературних даних є обмежена кількість наукових досліджень, що стосуються використання індукторів в процесі боротьби з біоплівками мікроорганізмів. У широкому доступі не наявна інформація щодо застосування еукаріотичних індукторів у деструкції біоплівки під впливом мікробних метаболітів, однак є дані щодо впливу клітин прокариот на синтез антимікробних сполук – ефективних протибіоплівкових агентів.

Науковці (Hifnawy et al., 2020) встановили, що спільне культивування *Micromonospora* sp. UR56 і *Actinokineospora* sp. EG49 викликало накопичення метаболітів, які не були виявлені в монокультурах таких актиноміцетів. Індуковані метаболіти були виділені та структурно охарактеризовані як уже відомий диметилфеназин-1,6-дикарбоксилат (1), монометиловий ефір феназин-1,6-дикарбонової кислоти (фенкоміцин; 2), феназин-1-карбонова кислота (туберміцин; 3), N-(2-гідроксифеніл)-ацетамід (9) і п-анізамід (10). Деякі із таких сполук виявили потужну антибіоплівкову активність проти *P. aeruginosa* із показниками інгібування 73-94 %, тоді як інші виявили слабку або помірну інгібуючу активність проти *E. coli* в діапазонах інгібування 34-54 % та помірну інгібуючу активність проти *S. aureus* з відсотком пригнічення 50-75 %.

Деструкція дріжджових біоплівки під впливом ПАР, синтезованих за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1

Субстрат	Тест-культура	Фізіологічний стан індуктора	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР концентрацією (мкг/мл)							
			880	440	220	110	55	27,5	13,7	6,8
Очищений гліцерин	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	Контроль (без індуктора)	57,7	55,1	50,3	41	38,2	28,2	20,1	16,2
		Супернатант	52,6	55,4	55,1	50,3	50,1	30,8	26,6	26,6
		Живі клітини	62,6	57,7	55,1	50,3	50,3	42,8	45,4	22,6
		Інактивовані клітини	52,8	52,8	41,8	33,1	31	26,4	28,2	28,2
Відходи виробництва біодизелю	<i>Candida tropicalis</i> PE-2	Контроль (без індуктора)	60	54,6	50	56,4	41,5	30	21,8	19
		Супернатант	100	100	100	73,8	69,2	54,4	40	27
		Живі клітини	100	100	100	100	88,2	62,3	56,4	27,4
		Інактивовані клітини	92,3	87,2	53,8	49,7	40	31,8	25	17,2
Очищений гліцерин	<i>Candida albicans</i> Д-6	Контроль (без індуктора)	66,9	65,7	57	40,6	32,5	29	24	18,1
		Супернатант	59,2	55,2	56,7	50,1	41,2	30	20,1	18,5
		Живі клітини	64,7	63,3	63,2	51,4	40	32,5	24,5	20,2
		Інактивовані клітини	57,7	46,8	50,7	45,5	38,0	26,5	20,1	10,5
Відходи виробництва біодизелю	<i>Candida albicans</i> Д-6	Контроль (без індуктора)	64,3	58,2	44,8	44,4	37,5	26,6	26,5	19,7
		Супернатант	н.в.	61,3	60	59,1	45,7	40,0	37,1	22,4
		Живі клітини	74,8	72,9	72	63,2	74,6	50	38,3	29,7
		Інактивовані клітини	56,3	55,9	56,6	46,2	42,6	40,2	38,1	20,5

Примітка. «н. в.» – не визначали.

Серед літературних даних відсутня інформація щодо використання клітин еукаріот в якості індукторів у руйнуванні біоплівки поверхнево-активними речовинами. Однак є дослідження щодо впливу ПАР, синтезованих за наявності бактеріальних індукторів, у підвищенні деструкції мікробних біоплівки (Hamza, Kumar, & Zinjarde, 2018; Gómez, Ramiro, Quesan, & de Melo Franco, 2016; Пирог, Скроцька, & Шевчук, 2020; Pirog, Kluchka, Skrotska, & Stabnikov, 2020; Pirog, & Ivanov, 2022).

Дослідники (Hamza, Kumar, & Zinjarde, 2018) виявили, що гліколіпіди після спільного культивування *Staphylococcus lentus* SZ2 та *Vibrio harveyi* MTCC 7771 здатні інгібувати біоплівку збудника *V. harveyi* MTCC 7771. Крім того, деструкція біоплівки *V. harveyi* після 24-годинної обробки ПАР, отриманим після культивування монокультури *Staphylococcus lentus* SZ2, становила 40%, тоді як під дією гліколіпідів після спільного культивування штамів досягала 79%.

У роботі (Gómez, Ramiro, Quesan, & de Melo Franco, 2016) було встановлено, що під час вирощування разом бактерій, що синтезують бактеріоцини (*Lactococcus lactis* VB69 і VB94, *Lactobacillus sakei* MBSa1) з іншими молочнокислими бактеріями (*Lactobacillus helveticus* 354, *Lactobacillus casei* 40, *Weissella viridescens* 113), було одержано поверхнево-активні речовини, які ефективно знищували біоплівку патогенних мікроорганізмів, таких як *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* O157: H7 і *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Так, за дії таких ПАР вдалося досягти шестилогарифмічного підвищення ступеня деструкції бактеріальних тест-культур, порівняно із показниками, встановленими для ПАР, одержаних за відсутності індуктора.

Так, у роботі (Пирог, Скроцька, & Шевчук, 2020) було виявлено, що за попереднього внесення індукторів (живі або інактивовані клітини) *E. coli* IEM-1 та *B. subtilis* БТ-2 у середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 синтезуються ПАР, що здатні до ефективного руйнування біоплівок. Ступінь деструкції за дії поверхнево-активних речовин, одержаних за наявності індукторів, щодо бактеріальних тест-культур (*E. coli* IEM-1, *B. subtilis* БТ-2, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *S. aureus* БМС-1) складав 73 – 93%, що у 1,5 – 2 рази вище, ніж відповідний показник для ПАР, синтезованих без індукторів.

В іншому дослідженні (Pirog, Kluchka, Skrotska, & Stabnikov, 2020) як біологічні індуктори також було використано живі клітини *E. coli* IEM-1 і *B. subtilis* БТ-2, які вже вносили у середовище культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Встановили, що незалежно від фізіологічного стану

(вегетативні або спорові клітини) та часу внесення у середовище (лаг-фаза або експоненційна фаза), одержані ПАР виявилися ефективними антибіоплівковими агентами. Наприклад, руйнування біоплівок *B. subtilis* БТ-2 за дії ПАР, синтезованих за наявності індукторів, було вищим (58–94 %), ніж деструкція біоплівок під впливом препаратів ПАР, одержаних без індуктора (48–65 %).

Під час подальших експериментів (Pirog, & Ivanov, 2022) виявили, що попереднє внесення клітин *B. subtilis* БТ-2 (живих чи інактивованих або супернатанту) у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 посилює не тільки антимікробну, а й антибіоплівкову активність. Найкращого ефекту вдалося досягти при внесенні саме живих клітин: ступінь деструкції таких ПАР (60 – 240 мкг/мл) складав 55 – 77%, у порівнянні із препаратами, одержаними за відсутності індуктора (50 – 70%). Використовувані в якості індуктора інактивовані клітини та супернатант БТ-2 показували такий же результат, як і препарати ПАР, синтезовані за відсутності індуктора.

Отже, одержані у ході експериментальних досліджень результати засвідчують, що здатність до деструкції біоплівок поверхнево-активними речовинами *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 істотно залежить від способу підготовки біологічного індуктора. Опираючись на доступні літературні дані та отримані нами результати, можна стверджувати, що найефективнішими із досліджуваних препаратів ПАР є такі, що синтезовані за участі живих клітин. Найвищого ступеня руйнування біоплівок (до 88,2 – 100%) такими ПАР можна досягти за використання доволі низьких концентрацій (55 – 220 мкг/мл).

Підвищена активність поверхнево-активних речовин за наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 пов'язана з необхідністю індукції біологічної взаємодії між продуцентом ПАР та дріжджовим індуктором. Автоклавування клітин конкурентного мікроорганізму може призвести до

денатурації білків та інших макромолекул, що, у свою чергу, може частково пригнічувати такі потенційні взаємодії.

3.3. Вплив *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовищі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на антиадгезивну активність синтезованих поверхнево-активних речовин

В основі одного з механізмів антиадгезивної активності мікробних ПАР є їх антимікробна дія, що зумовлена порушенням цілісності та функцій цитоплазматичної мембрани, яка супроводжується подальшим підвищенням гідрофобності мікробної поверхні. За рахунок таких змін під впливом поверхнево-активних речовин підвищується проникність клітинних мембран, а також змінюється поверхневий заряд мікробних клітин і, як наслідок, спостерігається порушення їх біологічних функцій (Ohadi et al., 2019). Тому на наступному етапі досліджень визначали антиадгезивну активність ПАР, синтезованих за присутності дріжджового індуктора у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із очищеним гліцерином.

Результати, показані у *табл. 3.8 – 3.10*, підтверджують, що при внесенні дріжджового індуктора у середовище як із очищеним гліцерином, так і відходами виробництва біодизелю можливо отримати ПАР із підвищеною антиадгезивною активністю. Так, адгезія ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині за наявності живих або інактивованих клітин, чи відповідного супернатанту *S. cerevisiae* БТМ-1, у діапазоні концентрацій 11 – 88 мкг/мл складала 14,5 – 90% і була нижчою, у порівнянні зі ступенями адгезії ПАР, синтезованих за відсутності індуктора (20 – 96%).

Схожі закономірності спостерігали після обробки абіотичних поверхонь розчинами ПАР синтезованих за вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю. За наявності *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовищі культивування продуцента спостерігали утворення поверхнево-активних речовин, після обробки розчинами яких ступінь адгезії бактерій і дріжджів на усіх досліджуваних поверхнях був нижчим у 1,5 – 2,3

рази порівняно із дією препаратів ПАР, синтезованих у середовищі без індуктора.

Встановлено, що найефективнішим із індукторів щодо *E. cloacae* С-8 був супернатант *S. cerevisiae* БТМ-1, за внесення якого у середовище з очищеним гліцерином синтезувалися ПАР із високою антиадгезивною активністю. Під впливом таких препаратів ПАР (11 – 88 мкг/мл) вдалося зменшити ступінь адгезії *E. cloacae* С-8 на кахлі на 5 – 10%, порівняно із використанням поверхнево-активних речовин, одержаних без індуктора. За внесення живих або інактивованих дріжджових клітин у середовище з очищеним гліцерином також отримали ПАР із вищою антиадгезивною активністю. Так, за обробки препаратами ПАР (11 – 88 мкг/мл), одержаних за внесенням живих або інактивованих клітин адгезія *E. cloacae* С-8 була на 1 – 14%, порівняно із показниками для ПАР, синтезованих без *S. cerevisiae* БТМ-1. За використання відходів виробництва біодизелю, були ефективними лише ПАР одержані за додаванням супернатанту та для окремих концентрацій ПАР (11; 22 мкг/мл) і характеризувалися в середньому на 11-17 % вищою антиадгезивною активністю (табл. 3.8).

Встановили, що під дією розчинів препаратів ПАР (11 – 88 мкг/мл), одержаних як на очищеному гліцерині, так і на відходах виробництва біодизелю за умови внесення живих дріжджових клітин або супернатанту вдалося зменшити ступінь адгезії *P. vulgaris* ПА-12 на кахлі на 9 – 71 або 3 – 61% відповідно порівняно із дією ПАР, синтезованих без індуктора. З усіх досліджуваних індукторів менш ефективними виявилися інактивовані клітини *S. cerevisiae* БТМ-1. Наявність інактивованих клітин у середовищі продуцента із гліцерином різного ступеня очищення ефективно впливала на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин (22 – 88 мкг/мл), шляхом зниження ступеня адгезії на 10 – 40%, порівняно із ПАР, що одержані за відсутності індуктора (табл. 3.8).

**Ступінь адгезії бактерій та дріжджів на кахлі за обробки ПАР А.
calcoaceticus IMB B-7241, синтезованих за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1**

Тест-культура	Субстрат для біосинтезу ПАР	Фізіологічний стан індуктора	Адгезія (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			88	44	22	11
<i>Enterobacter cloacae</i> C-8	Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	61	68	74	85
		Живі клітини	58	63	61	74
		Інактивовані клітини	60	63	66	71
		Супернатант	54	56	56	70
	Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	61	72	80	96
		Живі клітини	67	74	80	89
		Інактивовані клітини	75	70	79	90
		Супернатант	63	67	69	79
<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	96	75	90	96
		Живі клітини	25	44	70	80
		Інактивовані клітини	36	57	71	98
		Супернатант	35	43	71	85
	Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	77	85	99	98
		Живі клітини	31	64	75	89
		Інактивовані клітини	50	55	80	90
		Супернатант	29	50	64	95
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	87,5	87,5	95	98
		Живі клітини	25	35	45	80
		Інактивовані клітини	37	43	63	80
		Супернатант	28	59	70	95
	Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	78	85	98	98
		Живі клітини	75	79	80	86
		Інактивовані клітини	55	70	79	85
		Супернатант	65	71	74	89
<i>Candida albicans</i> Д-6	Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	50	57	75	78
		Живі клітини	30	29	46	79
		Інактивовані клітини	29	29	36	79
		Супернатант	46	48	52	70
	Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	50	61	69	78
		Живі клітини	30	36	62	78
		Інактивовані клітини	49	56	60	72
		Супернатант	48	55	72	81

Найвища антиадгезивна активність ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині за наявності живих або інактивованих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 спостерігалася і щодо *B. subtilis* БТ-2. Так, ступінь адгезії на кахлі такої тест-культури за дії ПАР (11 – 88 мкг/мл) був на 18 – 62,5% нижчим, порівняно із

впливом поверхнево-активних речовин, синтезованих без індуктора. Препарати ПАР (11 – 88 мкг/мл), одержані шляхом внесення у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із гліцерином різної якості дріжджового супернатанту також активно знижували адгезію *B. subtilis* БТ-2 на кахлі на 3 – 59,5%, порівняно із ПАР, утвореними без індуктора. За умови внесення живих або інактивованих клітин індуктора у середовище *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із відходами виробництва біодизелю спостерігали найменшу антиадгезивну активність синтезованих ПАР. Так, адгезія *B. subtilis* БТ-2 під впливом таких препаратів (22 – 88 мкг/мл) була знижена на 20 – 29 і 15 – 23% порівняно з показниками, встановленими для препаратів, синтезованих без індуктора (табл. 3.8).

Інактивовані клітини виявилися найкращими індукторами для зменшення адгезії *C. albicans* Д-6 за обробки ПАР (22 – 88 мкг/мл), одержаних на очищеному гліцерині. Так, у середньому на 40% вдалося зменшити адгезію дріжджових культур, порівняно з показниками, встановленими для препаратів, синтезованих без індуктора. Схожу закономірність спостерігали за використання ПАР (22 – 88 мкг/мл), синтезованих за наявності живих клітин у середовищі як з очищеним гліцерином, так і відходами виробництва біодизелю. Так, за дії відповідних препаратів ПАР адгезія тест-культури була меншою на 7 – 29%, ніж для встановлених значень ПАР, одержаних без індуктора. Внесення дріжджового супернатанту у середовище із очищеним гліцерином сприяло синтезу ПАР, які в усьому досліджуваному діапазоні (11 – 88 мкг/мл) знижували адгезію на 4 – 23% порівняно із ПАР, синтезованих без індуктора (табл. 3.8).

Найефективнішими антиадгезивними агентами щодо *P. vulgaris* ПА-12 на сталі виявилися препарати ПАР, одержані за наявності інактивованих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 на гліцерині різної якості, антиадгезивна активність яких за широкого діапазону концентрації (11 – 88 мкг/мл) знизилася на 2 – 40%, порівняно з обробкою ПАР, одержаних без індуктора. ПАР (44 – 88 мкг/мл), синтезовані за наявності живих клітин індуктору на

відходах виробництва біодизелю, зменшували адгезію тест-культури на 33 – 43%, порівняно із препаратами, утвореними без *S. cerevisiae* БТМ-1. За дії препаратів ПАР (44 – 88 мкг/мл), синтезованих як на очищеному гліцерині, так і на відходах виробництва біодизелю за наявності супернатанту, ступінь адгезії *P. vulgaris* ПА-12 вдалося знизити на 9 – 17 і 20 – 33% відповідно, порівняно зі встановленими значеннями для ПАР, одержаних без індуктора (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Вплив ПАР, синтезованих за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1 на ступінь адгезії *P. vulgaris* ПА-12 і *B. subtilis* БТ-2 на сталі

Тест-культура	Субстрат	Фізіологічний стан індуктора	Ступінь адгезії (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			88	44	22	11
<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	70	76	75	89
		Живі клітини	60	67	75	98
		Інактивовані клітини	34	40	46	87
		Супернатант	53	67	92	98
	Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	73	80	89	98
		Живі клітини	30	47	92	98
		Інактивовані клітини	34	40	75	98
		Супернатант	40	60	67	87
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	71	79	82	98
		Живі клітини	40	43	65	79
		Інактивовані клітини	40	55	80	95
		Супернатант	17	28	55	82
	Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	85	89	93	98
		Живі клітини	70	77	85	89
		Інактивовані клітини	77	77	90	98
		Супернатант	82	82	90	98

Виявили, що найвищою антиадгезивною активністю щодо *B. subtilis* БТ-2 характеризуються поверхнево-активні речовини, синтезовані на очищеному гліцерині за присутності дріжджового супернатанту. Так, ступінь адгезії на сталі за дії препаратів ПАР (11 – 88 мкг/мл) був нижчим на 16 – 54%, ніж відповідний показник для поверхнево-активних речовин, одержаних без індуктора. Живі та інактивовані клітини біологічного індуктора, що вносилися у середовище із обома субстратами, проявляли меншу антиадгезивну активність. Так препарати ПАР (11 – 88 мкг/мл),

синтезовані за наявності живих та інактивованих клітин зменшували адгезію клітин на 8 – 36 та 2 – 31% порівняно із дією препаратів ПАР, одержаних без індуктора (табл. 3.9).

На очищеному гліцерині найефективнішими антиадгезивними агентами щодо *P. vulgaris* ПА-12 на лінолеумі виявилися ПАР одержані за наявності живих клітин індуктору. Так, ступінь адгезії ПА-12 за дії таких ПАР (11 – 88 мкг/мл) був нижчим на 23 – 50%, ніж відповідний показник для поверхнево-активних речовин, синтезованих без індуктора. Дріжджовий супернатант помірно впливав на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин, одержаних на відходах виробництва біодизелю, знижуючи адгезію ПА-12 на 9 – 40%, порівняно з обробкою препаратами ПАР (22 – 88 мкг/мл), одержаними за відсутності індуктора. Інактивовані клітини *S. cerevisiae* БТМ-1 найкраще впливали на дію ПАР (88 мкг/мл), синтезованих на очищеному гліцерині, знижуючи ступінь адгезії *P. vulgaris* ПА-12 на 33% (табл. 3.10).

Встановили, що найнижчий ступінь адгезії *B. subtilis* БТ-2 було отримано за обробки ПАР, синтезованих на гліцерині різної якості за наявності живих клітин або супернатанту *S. cerevisiae* БТМ-1. За дії таких препаратів ПАР (11 – 88 мкг/мл) прикріплення *B. subtilis* БТ-2 до лінолеуму було нижчим на 10 – 64 і 20 – 65% відповідно, ніж за використання поверхнево-активних речовин, одержаних без внесення індукторів. Препарати ПАР, одержані на відходах виробництва біодизелю (11 – 88 мкг/мл) або очищеному гліцерині (44 – 88 мкг/мл) за наявності інактивованих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, також активно впливали на адгезію *B. subtilis* БТ-2, знижуючи її на 9 – 34 та 20%, порівняно із показниками для ПАР, утворених без індуктора (табл. 3.10).

**Адгезія *P. vulgaris* ПА-12 і *B. subtilis* БТ-2 на лінолеумі за дії ПАР,
одержаних за наявності *S. cerevisiae* БТМ-1**

Тест-культура	Субстрат	Фізіологічний стан індуктора	Ступінь адгезії (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			88	44	22	11
<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	74	77	78	95
		Живі клітини	24	35	55	72
		Інактивовані клітини	41	76	79	85
		Супернатант	52	80	92	97
	Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	71	73	98	98
		Живі клітини	69	73	91	98
		Інактивовані клітини	81	85	98	98
		Супернатант	31	48	89	98
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	74	79	95	98
		Живі клітини	10	18	59	88
		Інактивовані клітини	54	59	95	98
		Супернатант	12	14	45	75
	Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	75	89	95	98
		Живі клітини	33	45	55	79
		Інактивовані клітини	42	55	66	89
		Супернатант	38	46	75	98

Вищеописані результати показують, що на антиадгезивну активність ПАР можуть впливати такі фактори: концентрація досліджуваних ПАР, тип абіотичного матеріалу і обрана тест-культура. Отже, одержані під час експерименту дані (табл. 3.8 – 3.10) свідчать про те, що за умови внесення еукаріотичного індуктора *S. cerevisiae* у середовище із гліцерином різної якості, можливою є регуляція антиадгезивної активності синтезованих ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241.

На даний момент, недостатньо вивчено вплив біологічних індукторів на антиадгезивну активність антимікробних сполук, зокрема дії еукаріотичних індукторів на зниження адгезії поверхнево-активними речовинами. Однак у літературі наявна інформація щодо впливу прокаріотичних клітин на антиадгезивну активність ПАР (Пирог, Скроцька, & Шевчук, 2020; Pirog, Kluchka, Skrotska, & Stabnikov, 2020; Pirog, & Ivanov, 2022).

Під час досліджень (Пирог, Скроцька, & Шевчук, 2020) було встановлено, що синтезовані ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за присутності *E. coli* ІЕМ-1 та *B. subtilis* БТ-2 володіють також і вищою антиадгезивною активністю. Ступінь адгезії попередньо зазначених тест-культур (див. підрозділ 2.2) на полістиролі після оброблення препаратами ПАР, одержаними за наявності як живих, так і інактивованих бактеріальних клітин, був у середньому на 16–23 % нижчим, ніж у разі використання при обробці цієї поверхні поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі без індукторів.

В іншій роботі (Pirog, Kluchka, Skrotska, & Stabnikov, 2020) описано використання клітин *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 в якості індукторів регуляції біологічної активності ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Адгезія тест-культур *C. albicans* Д-6 і *S. aureus* БМС-1 до абіотичних поверхонь (керамічна плитка, скло і сталь), оброблених поверхнево-активними речовинами, синтезованими *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за присутності інактивованих клітин бактеріальних індукторів, становила від 7 до 39 %. Такий показник був нижчим, ніж адгезія бактеріальних та дріжджових клітин за обробки препаратами ПАР, утвореними без участі індуктора (33–87 %).

У нещодавніх дослідженнях (Pirog, & Ivanov, 2022) зазначається, що після внесення живих, інактивованих чи відповідного супернатанту *B. subtilis* БТ-2 у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, можна отримати ПАР із підвищеною антиадгезивною активністю. Після обробки розчинами таких ПАР (96 мкг/мл) ступінь прикріплення тест-культур (*B. subtilis* БТ-2, *P. vulgaris* ПА-12, *E. cloacae* С-8, *S. aureus* БМС-1, *C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2) на абіотичних поверхнях (сталь і лінолеум) був у 2 – 5 разів нижчим, ніж після обробки препаратами ПАР, синтезованими без індуктора.

Отже, одержані результати свідчать про можливість підвищення антиадгезивної активності ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих як на очищеному, так і на відходах виробництва біодизелю, у присутності

дріжджового індуктора *S. cerevisiae* БТМ-1 у вигляді живих, інактивованих клітин і відповідного супернатанту.

**РОЗДІЛ 4. СИНЕРГІЗМ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СУМІШІ
ЕФІРНИХ ОЛІЙ ТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА
НАЯВНОСТІ ЕУКАРІОТИЧНОГО ІНДУКТОРА**

Резистентність до антибіотиків викликає велику стурбованість, оскільки призводить до глобальних ризиків для здоров'я населення. Задля розв'язання цих проблем проводяться дослідження у кількох напрямках: по-перше, йде пошук альтернативних антибіотикам речовин природного походження, до яких відносяться нетоксичні біодеградабельні мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) (Ceresa, Fracchia, Fedeli, Porta, & Vanat, 2021); по-друге, спільне культивування продуцентів антимікробних сполук з конкурентними мікроорганізмами з метою підвищення їхньої антимікробної активності та/або синтезу цільового продукту (Hifnawy et al., 2020; Ait Dra et al., 2017).

Рослини є природним джерелом різних вторинних метаболітів із високою антимікробною активністю, наприклад ефірних олій (Serahvand et al., 2014). Застосування ефірних олій у комплексі з антибіотичними сполуками може призвести до виявлення нових або вдосконалення вже відомих способів лікування інфекційних захворювань. Багато дослідників експериментально вивчали синергічний ефект, який виникає в результаті використання антибіотиків з різними рослинними екстрактами (Vitanza et al., 2018; Grădinaru et al., 2018). Таким чином, ця комбінація дозволила знизити стійкість бактерій до таких препаратів (Moussaoui, & Alaoui, 2016).

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 4. Синергізм біологічної активності суміші ефірних олій та поверхнево-активних речовин Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, синтезованих за наявності еукаріотичного індуктора</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Парфенюк М.А.</i>						78	130
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>							78
<i>Н. конто</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Раніше було встановлено, що за попереднього внесення дріжджового індуктора *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1 у середовище культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 із гліцерином різної якості, вдалося синтезувати поверхнево-активні речовини із вищою антимікробною активністю. Тому припустили, що додавання до таких ПАР ефірних олій буде супроводжуватися утворенням комплексного препарату із синергічною антимікробною дією та здатністю до руйнування біоплівки.

4.1. Антимікробна активність комплексу поверхнево-активних речовин та ефірних олій

На першому етапі було здійснено дослідження щодо впливу живих клітин індуктора на можливість синергізму антимікробної активності ПАР, синтезованих штамом ІМВ В-7241, за умов вирощування на гліцерині різної якості. Так, у *табл. 4.1* наведено отримані показники антибактеріальної активності поверхнево-активних речовин, одержаних *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності живих клітин дріжджового індуктора, ефірної олії чайного дерева та їх суміші.

Встановили, що поверхнево-активні речовини, синтезовані за наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 як з очищеним гліцерином, так і з відходами виробництва біодизелю, проявляли синергізм антибактеріальної дії з ефірною олією чайного дерева. Так, наприклад, МІК поверхнево-активних речовин, синтезованих за попереднього внесення таких клітин у середовище продуцента із очищеним гліцерином, щодо *Proteus vulgaris* ПА-12 та *Staphylococcus aureus* БМС-1 становили 33,75 та 16,88 мкг/мл, ефірної олії чайного дерева – 62,5 мкг/мл, а їх суміші – 15,63 та 31,25 мкг/мл відповідно. Використання ПАР, одержаних наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 на відходах виробництва біодизелю, у комплексі з такою ефірною олією дає змогу знизити МІК останньої щодо *P. vulgaris* ПА-12 та *S. aureus* БМС-1 із 62,5 мкг/мл до 1,23 мкг/мл.

Встановили, що за дії суміші поверхнево-активних речовин, які були отримані при вирощування продуцента на відходах виробництва біодизелю за внесення живих дріжджових клітин, із ефірною олією чайного дерева вдалося знизити МІК щодо *E. cloacae* С-8 і *B. subtilis* БТ-2 у 20 і 40 разів відповідно, порівняно із такими показниками для ПАР, що вносилися окремо. Також було виявлено, що при внесенні комплексного препарату ПАР, синтезованих за наявності індуктора у середовищі із гліцерином різної якості, із ефірною олією, МІК останньої був нижчим у 50 – 60 разів щодо *E. cloacae* С-8 та у 200 – 470 разів проти *B. subtilis* БТ-2, ніж відповідний показник для олії, що вносилася окремо.

Відповідно до даних, наведених у *табл. 4.1*, показник фракційної інгібуючої концентрації не перевищував 0,5 (за винятком ФІК для суміші ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині без індуктора, з олією чайного дерева щодо штаму ПА-12), що вказує на синергізм антимікробної дії таких біоцидних сполук.

У *табл. 4.2* представлено результати щодо антифунгальної дії ПАР, синтезованих при наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, ефірної олії кориці та їх комплексу. Встановили, що мінімальні інгібуючі концентрації ПАР, одержаних за внесення дріжджових клітин у середовище *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із очищеним гліцерином, щодо *C. albicans* Д-6 та *C. tropicalis* РЕ-2 становили 8,4 мкг/мл, ефірної олії кориці – 250 мкг/мл, а їх суміші – 31,25 та 15,63 мкг/мл відповідно. Зокрема, за дії комплексу із такими препаратами поверхнево-активних речовин МІК ефірної олії кориці вдалося знизити до 0,26 мкг/мл.

Схожі закономірності спостерігали і при застосуванні ПАР, синтезованих за додавання еукаріотичного індуктора у середовище з відходами виробництва біодизелю. Показники МІК таких поверхнево-активних речовин у суміші з ефірною олією щодо дріжджів роду *Candida* були у 2,5 – 5 разів нижчими, ніж мінімальні інгібуючі концентрації самих препаратів ПАР.

Таблиця 4.1

Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на гліцерині різної якості за наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, ефірної олії чайного дерева та їх суміші

Тест-культура	Гліцерин як субстрат	Наявність індуктора у середовищі культивування	МІК за дії (мкг/мл)			
			ПАР	Суміші ПАР та ефірної олії*	Суміші ефірної олії та ПАР**	ФІК, ФІК ≤0,5 – синергізм
<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	Очищений	–	100	25	16,875	0,385
		+	16,88	2,1	31,25	0,37
	Відходи виробництва біодизелю	–	185	2,9	3,9	0,05
		+	157,5	2,45	3,9	0,047
<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	Очищений	–	200	25	31,25	0,625
		+	33,75	4,2	15,63	0,37
	Відходи виробництва біодизелю	–	185	5,78	15,63	0,28
		+	78,75	1,23	15,63	0,26
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Очищений	–	100	3,1	31,25	0,156
		+	67,5	0,53	15,63	0,07
	Відходи виробництва біодизелю	–	370	11,56	15,63	0,1
		+	315	1,23	15,63	0,07
<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	Очищений	–	25	0,78	31,25	0,5
		+	16,88	0,26	31,25	0,52
	Відходи виробництва біодизелю	–	92,5	1,44	15,63	0,27
		+	78,75	1,23	15,63	0,27

Примітка. Табл. 4.1 та 4.2: під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5%; показник МІК ефірної олії чайного дерева щодо *B. subtilis* БТ-2 і *E. cloacae* С-8 становив 250 і 125 мкг/мл відповідно, щодо *P. vulgaris* ПА-12 і *S. aureus* БМС-1 – 62,5 мкг/мл; * — концентрація ПАР залишалася незмінною, а концентрацію ефірної олії знижували методом послідовних двократних розведень, ** — концентрація ефірної олії залишалася незмінною, а концентрацію ПАР зменшували методом послідовних двократних розведень.

Аналогічні результати показника ФІК ($\leq 0,5$) спостерігаємо і щодо дріжджових тест-культур. Дані, показані у *табл. 4.2*, вказують на синергізм антифунгальної дії ПАР, синтезованих за внесення еукаріотичного індуктора у середовище *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, із ефірною олією кориці проти дріжджів роду *Candida*.

У наукових статтях не представлено даних щодо синергічної дії ефірних олій із мікробними вторинними метаболітами, синтезованими за участі біологічних індукторів. Також доволі обмежена інформація щодо синергічної дії комплексу мікробних ПАР з ефірними оліями. Однак у літературі більше зустрічаються дані щодо синергізму антимікробної дії ефірних олій або поверхнево-активних речовин із іншими антимікробними вторинними метаболітами, а саме антибіотиками.

Достатня кількість робіт присвячена дослідженням синергічної дії ефірних олій із антибіотиками проти бактеріальних штамів (Asadi et al., 2023; Iseppi, Condò, & Messi, 2023; Gan, Langa, Valenzuela, Ballester, & Pino-Otín, 2023; Aleksic Sabo, Nikolic, Mimica-Dukic, & Knezevic, 2021; Özel, Yılmaz, & Ünlü, 2022; El Atki et al., 2019). Так, наприклад, у дослідженні (Asadi et al., 2023) було встановлено, що карвакрол - компонент ефірної олії та цефіксим здатні проявляти синергічну антимікробну дію проти *E. coli* за показником ФІК 0,5.

Таблиця 4.2

Антифунгальна активність ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованих на гліцерині різної якості за наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, ефірної олії кориці та їх суміші

Тест-культура	Гліцерин як субстрат	Наявність індуктора у середовищі культивування	МІК за дії (мкг/мл)			
			ПАР	Суміші ПАР та ефірної олії*	Суміші ефірної олії та ПАР**	ФІК, ФІК ≤ 0,5 – синергізм
<i>Candida albicans</i> Д-6	Очищений	–	12,5	0,39	62,5	0,253
		+	8,4	0,26	31,25	0,128
	Відходи виробництва біодизелю	–	185	1,44	62,5	0,258
		+	157,5	0,62	31,25	0,129
<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	Очищений	–	12,5	0,39	62,5	0,253
		+	8,4	0,26	15,63	0,07
	Відходи виробництва біодизелю	–	46,25	1,44	62,5	0,253
		+	39,4	0,15	15,63	0,07

Примітка. Показник МІК ефірної олії кориці щодо дріжджів роду *Candida* становив 250 мкг/мл

У роботі (Özel, Yılmaz, & Ünlü, 2022) також було досліджено вплив суміші попередньо зазначених компонентів ефірної олії кмину із антибіотиками (тигецикліном, лінезолідом, гентаміцином та тетрацикліном) щодо бактеріальних тест-культур. Було встановлено, що комплекс тигецикліну із карвакролом продемонстрував помітний синергічний ефект як проти *E. coli*, так і *P. aeruginosa* (ФІК = 0,25). Використання суміші лінезоліду як і з тимолом, так і з евгенолом проти *E. coli* показало значення ФІК, що становило 0,375. Такі комплексні препарати як карвакрол із гентаміцином та евгенол із тигецикліном продемонстрували значну синергічну дію щодо *P. aeruginosa* (ФІК = 0,375). Дія сумішей карвакролу із тетрацикліном, а також тимолу із тигецикліном проявляли синергічну антимікробну дію щодо *P. aeruginosa* зі значеннями ФІК 0,5 та 0,187 відповідно.

Дослідниками (Iseppi, Condò, & Messi, 2023) було показано, що за використання суміші ефірних олій чайного дерева та евкаліпту із оксациліном щодо різних штамів *S. aureus* вдалося досягти синергічного антимікробного ефекту. Так, за дії комплексу ефірної олії чайного дерева та оксациліну проти досліджуваних штамів *S. aureus* 13 і 20 ФІК становив 0,19. Щодо *S. aureus* 32 показник ФІК складав 0,5 як під впливом оксациліну із олією чайного дерева, так і з олією евкаліпту.

У роботі (Gan, Langa, Valenzuela, Ballester, & Pino-Otín, 2023) встановили, що при застосуванні суміші ефірної олії тимолу як зі стрептоміцином, так і гентаміцином проти *S. aureus*, а також такої ефірної олії із хлорамфеніколом проти *Acinetobacter baumannii*, вдалося досягти значного синергічного ефекту (ФІК = 0,375). Також автори зазначили, що МІК антибіотиків знизився з 62,5 до 7,8 мкг/мл. Використання комплексу ефірної олії тимолу зі стрептоміцином дозволило знизити показник МІК антибіотика проти *Streptococcus agalactiae* у 4 рази та продемонструвало синергізм антимікробної дії (ФІК = 0,5).

Науковці (Aleksic Sabo, Nikolic, Mimica-Dukic, & Knezevic, 2021) дослідили антимікробну активність тимолу, евгенолу і карвакролу (основних антимікробних компонентів ефірної олії кмину), антибіотиків гентаміцину і ципрофлоксацину та їх сумішей. Було встановлено, що за використання гентаміцину (1/8 МІК) з евгенолом (1/4 МІК) проти *A. baumannii* значення ФІК становило 0,46, що підтверджує синергетичну дію для досліджуваної бактерії. За дії суміші ципрофлоксацину із тимолом, карвакролом або евгенолом також спостерігали синергізм, оскільки показник ФІК складав від 0,25 до 0,32.

Дослідниками (El Atki et al., 2019) було встановлено синергічну антибактеріальну дію ефірної олії кориці із антибіотиками проти *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923. Так, значення ФІК для суміші ефірної олії кориці із хлорамфеніколом становили 0,5 для кожної із тест-культур. Комплекс такої ефірної олії із ампіциліном продемонстрував синергічну дію проти *S. aureus* ATCC 25923 за показником ФІК 0,38. Крім того, мінімальні інгібуючі концентрації кожної антимікробної сполуки у суміші були у 2 – 4 рази нижчими, порівняно із встановленими показниками МІК як для ефірної олії, так і антибіотиків, використовуваних окремо.

У літературі також зустрічаються роботи по дослідженню синергічного ефекту ефірних олій із антифунгальними засобами (Parker, Gabriel, Graham, Butts, & Cornelison, 2022; Angiolella, 2021; Essid et al., 2017; Sharifzadeh, Khosravi, Shokri, & Tari, 2017). У дослідженні (Angiolella, 2021) було показано, що при застосуванні суміші ефірної олії пеларгонії із флуконазолом спостерігалася синергічна антифунгальна дія проти усіх досліджуваних штамів *C. albicans* зі значеннями ФІК 0,5. Також було показано, що МІК кожної з антимікробних сполук у такій суміші знизився до 390 мг/мл та 0,0625 мг/мл відповідно.

В іншій роботі (Essid et al., 2017) також було досліджено синергічну дію різноманітних комбінацій ефірних олій із флуконазолом проти дріжджів роду *Candida*. Встановили, що найвищої синергії вдалося досягти за

використання комплексів флуконазолу із ефірними оліями *Pelargonium graveolens* та *Cinnamomum verum* (значення ФІК склали 0,37). Такі комбінації дозволили знизити ефективні концентрації обраних біоцидів у 4 – 8 разів.

У роботі (Parker, Gabriel, Graham, Butts, & Cornelison, 2022) було встановлено, що за використання суміші ефірних олій гвоздики або лемонграсу із антибіотиками (флуцитозин, флуконазол та мікафунгін) можна досягти синергічної антимікробної дії щодо дріжджових тест-культур. Комплексний препарат ефірної олії гвоздики із флуконазолом продемонстрував значний синергізм щодо *C. auris* AR0381, *C. lusitaniae* AR0398 та *S. cerevisiae* AR0399 зі значеннями ФІК 0,28; 0,0625 та 0,5. Автори також зазначили, що значення ФІК для суміші ефірної олії гвоздики із флуцитозином щодо *C. auris* AR0381 складав 0,1875, а для ефірної олії лемонграсу із мікафунгіном проти *S. cerevisiae* AR0399 – 0,375.

Авторами (Sharifzadeh, Khosravi, Shokri, & Tari, 2017) було встановлено, що суміш ефірної олії ментолу у поєднанні з ітраконазолом або ністатином також виявляє синергічний ефект проти всіх досліджуваних видів *Candida*. Значення ФІК для комбінацій ментолу з ітраконазолом і ністатином коливалися від 0,250 до 0,561 і 0,139 до 0,623 щодо штамів *C. glabrata* та від 0,182 до 0,750 і 0,188 до 0,760 проти *C. krusei* відповідно.

Незначна кількість робіт присвячена дослідженню синергічної антимікробної дії комплексу ПАР із ефірними оліями (Naba et al., 2014; Pirog et al., 2020; Pirog, Kliuchka, Kliuchka, Shevchuk, & Iutynska, 2020) або антибіотиками (Olfa et al., 2015; Pirog et al., 2020). У роботі (Olfa et al., 2015) було досліджено антимікробну активність комплексу бациломіцину D, синтезованого *B. subtilis* В38, із амфотерицином В проти щодо дріжджів роду *Candida*. Виявили, що за дії суміші з антибіотиком вдалося знизити МІК ПАР у 8 – 25 разів проти усіх досліджуваних дріжджових штамів. Крім того, можна стверджувати про синергізм антимікробної дії бациломіцину D з амфотерицином В, оскільки показник ФІК становив від 0,27 до 0,5.

Дослідниками (Pirog et al., 2020) було показано, що ПАР, синтезовані *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 на відходах виробництва біодизелю або відпрацьованій олії, проявляли синергізм антимікробної дії із ципрофлоксацином або офлоксацином. Показник фракційної інгібуючої концентрації не перевищував 0,5 (за винятком ФІК для суміші ПАР, одержаних на відпрацьованій олії, із ципрофлоксацином проти *E. coli* IEM-1). Аналогічна закономірність спостерігалася для таких препаратів ПАР із ефірною олією чайного дерева. Значення фракційної інгібуючої концентрації було нижчим за 0,5, що вказує на синергізм їх суміші.

У роботі (Pirog, Kliuchka, Kliuchka, Shevchuk, & Iutynska, 2020) було досліджено синергічний ефект ефірних олій кориці та лемонграсу та ПАР штаму *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 проти дріжджів роду *Candida*. Встановили, що ПАР, одержані на середовищі з рафінованою або відпрацьованою соняшниковою олією, виявляють синергетичний антимікробний ефекту у суміші з ефірними оліями кориці та лемонграсу. Використання такої суміші проти *C. albicans* D-6 та *C. tropicalis* RE-2 призвело до зниження не лише МІК поверхнево-активних речовин (з 16–78 до 4–19 мкг/мл), але й до зниження значень МІК ефірних олій в 8–130 разів.

Науковцями (Naba et al., 2014) було виявлено, що суміш рамноліпідів, синтезованих *Pseudomonas aeruginosa* 47T2, та ефірних олій чайного дерева, лаванди, орегано та кориці проявляє високу антимікробну дію проти *S. aureus* ATCC 43300 та *C. albicans* ATCC 10231. Встановили, що під впливом емульсії вода : ПАР : ефірна олія чайного дерева у співвідношенні 71,8 : 2,8 : 25,3% зона пригнічення росту штаму ATCC 43300 становила 15,2 мм, що є на 4,2 – 6,2 мм вищою, ніж за використання кожної з речовин окремо. Щодо дріжджового штаму ATCC 10231 найефективнішими сумішами виявилися вода : ПАР : ефірна олія орегано (72,2 : 11,1 : 16,7%) і вода : ПАР : ефірна олія кориці (80,9 : 1,9 : 17,1%), що пригнічували ріст за зоною інгібування 39,3 та 36,0 мм відповідно.

Отже, одержані результати засвідчують, що ПАР, синтезовані за внесення живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із гліцерином різної якості, демонструють синергічну антимікробну дію у комплексі із ефірними оліями. Використання суміші таких поверхнево-активних речовин із даними біоцидними сполуками дає змогу знизити МІК самих ПАР та ефірних олій у 2 – 47 та 2,5 – 250 разів відповідно.

4.2. Деструкція мікробних біоплівоч за дії комплексу поверхнево-активних речовин із ефірними оліями

В основі механізмів руйнування біоплівоч під впливом мікробних поверхнево-активних речовин лежить антимікробна дія таких сполук (Sharma, Misba, & Khan, 2019). Тому далі продовжували дослідження здатності до деструкції мікробних біоплівоч суміші ефірних олій із поверхнево-активними речовинами *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованими за попереднього внесення дріжджового індуктора у середовище із гліцерином різного ступеня очистки.

Так, у табл. 4.3 – 4.8 продемонстровано результати синергічної дії ПАР, одержаних за внесення живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовище культивування штаму ІМВ В-7241 із гліцерином різного ступеня очищення, та ефірних олій у руйнуванні бактеріальних та дріжджових біоплівоч. Встановлено, що при використанні суміші ПАР із ефірними оліями вдалося збільшити ступінь деструкції як бактеріальних, так і дріжджових біоплівоч більшості досліджуваних тест-культур, порівняно із дією кожного антимікробного агента окремо.

Так, ступінь деструкції біоплівоч за дії комплексу ефірної олії чайного дерева із ПАР, синтезованих за внесення індуктора у середовище з очищеним гліцерином, щодо бактерій *S. aureus* БМС-1 був вищим в усьому досліджуваному діапазоні концентрацій, порівняно з використанням окремо препаратів ПАР в 1,1 – 1,8 разів та окремо ефірної олії в 1,5 – 3,1 рази. Аналогічні закономірності спостерігалися при застосуванні суміші ефірної

олії із ПАР, одержаними на відходах виробництва біодизелю за додавання живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1. Так, ступінь руйнування бактеріальної біоплівки при застосуванні такої суміші був вищим за показники, встановлені окремо для таких ПАР і ефірної олії у 1,1 та 1,3 – 1,7 разів відповідно (табл. 4.3).

Виявили, що зі зменшенням концентрації ПАР, синтезованих за внесення живих дріжджових клітин у середовище із гліцерином різного ступеня кості, та використовуваних як окремо, так і в суміші з олією чайного дерева, ступінь деструкції біоплівок *B. subtilis* БТ-2 поступово зростає (табл. 4.4). Так, за дії ПАР, одержаних при рості на середовищі з очищеним гліцерином та клітинами *S. cerevisiae* БТМ-1, у суміші з ефірною олією або окремо (15,6 – 31,25 мкг/мл), ступінь деструкції біоплівок даної тест-культури досягав 100%, що був у 2,4 – 4,2 рази вищим, ніж встановлений показник для олії чайного дерева.

Таблиця 4.3

Руйнування біоплівки *S. aureus* БМС-1, за дії ПАР, одержаних *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності живих клітин *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1, ефірної олії чайного дерева та їх суміші

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для біосинтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія чайного дерева	–	–	59	52	48	34	25	13
ПАР	Очищений	–	80	60	50	41	36	28
		+	86	71	62	54	41	22
	Відходи виробництва біодизелю	–	63	44	30	34	26	15
		+	100	83	51	38	41	21
ПАР+ефірна олія чайного дерева	Очищений	–	84	50	47	34	30	24
		+	100	88	70	59	46	40
	Відходи виробництва біодизелю	–	86	60	52	38	33	17
		+	92	89	60	45	42	22

Примітка. Табл. 4.3 – 4.8: під час визначення ступеня деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5%.

Таблиця 4.4

Деструкція біоплівки *B.subtilis* БТ-2, за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності живих дріжджових клітин, ефірної олії чайного дерева та їх суміші

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для біосинтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія чайного дерева	–	–	47	72	63	54	42	24
ПАР	Очищений	–	100	100	94	72	60	50
		+	68	78	80	90	100	100
	Відходи виробництва біодизелю	–	75	72	70	69	55	42
		+	72	75	72	100	100	32
ПАР+ефірна олія чайного дерева	Очищений	–	100	100	88	85	57	60
		+	44	63	69	78	100	100
	Відходи виробництва біодизелю	–	100	100	72	53	40	32
		+	47	63	72	75	94	98

Схожу закономірність спостерігали при використанні комплексу ефірної олії та поверхнево-активних речовин, що були отримані у процесі культивування продуцента на відходах виробництва біодизелю за внесення живих клітин індуктора. За внесення такої суміші (15,6 – 31,25 мкг/мл) ступінь руйнування біоплівки *B. subtilis* БТ-2 складав 94 – 98%.

Встановлено, що ступінь руйнування бактеріальних біоплівок *E. cloacae* С-8 за дії комплексу ефірної олії чайного дерева із ПАР, синтезованих за внесення індуктора у середовище продуцента з очищеним гліцерином, був вищим в усьому досліджуваному діапазоні концентрацій, порівняно з використанням таких монопрепаратів ПАР в 1,3 – 1,5 рази. Зі зниженням концентрації препаратів використаної суміші ефірної олії чайного дерева із ПАР, одержаними при наявності у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з відходами виробництва біодизелю, ступінь деструкції біоплівок відповідної тест-культури поступово зростав та був у 1,3 – 1,5 та 1,1 – 1,5 рази вищим, ніж за використання окремо ПАР або ефірної олії відповідно. Так, наприклад за дії такої суміші у концентрації антимікробних сполук 15,6 – 62,5 мкг/мл ступінь деструкції біоплівок *E. cloacae* С-8 досягав 100% (табл. 4.5).

Виявлено, що при збільшенні концентрації досліджуваних антимікробних сполук, які використовували як у вигляді монопрепаратів, так і комплексів, ступінь руйнування біоплівок *P. vulgaris* ПА-12 поступово зростав (табл. 4.6). Використання комплексу ПАР, синтезованих за участі біологічного індуктора як на очищеному гліцерині, так і на відходах виробництва біодизелю, із ефірною олією чайного дерева дозволило підвищити ступінь деструкції даної тест-культури 1,1 – 2 рази, порівняно із дією монопрепаратів таких поверхнево-активних речовин або ефірної олії.

Таблиця 4.5

Ступінь деструкції біоплівки *E. cloacae* C-8, за дії ПАР, синтезованих за наявності дріжджового індуктора у середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241, ефірної олії чайного дерева та їх суміші

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для синтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія чайного дерева	–	–	100	90	81,8	80	71,8	65
ПАР	Очищений	–	70,9	66,8	61,4	56,4	52,3	38,6
		+	77,3	68,2	67,7	61	50	43,2
	Технічний	–	81,4	75	72,7	70,7	67,3	55
		+	85,5	80,5	72,7	74	71,8	67,3
ПАР+ ефірна олія чайного дерева	Очищений	–	100	88,6	84,1	80	66,4	60
		+	98,2	95,5	86,4	80	70	65
	Технічний	–	100	100	91	84,1	70	60
		+	43,2	58,6	91	100	100	100

Таблиця 4.6

Руйнування біоплівки *P. vulgaris* ПА-12, за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності дріжджового індуктора, ефірної олії чайного дерева та їх суміші

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для синтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія чайного дерева	–	–	65	50,3	38,8	36,5	29,2	27
ПАР	Очищений	–	47,3	42	30	21,6	17,6	16,2
		+	50,5	48,6	47,3	42	25,7	28,4
	Технічний	–	58,1	40,5	35,1	32,4	36,5	30
		+	60	54,3	44,3	37	32,4	34
ПАР+ ефірна олія чайного дерева	Очищений	–	54,6	47,8	44,6	42	35,1	32,7
		+	65	57,3	55	53,8	48,4	40
	Технічний	–	67,3	60,8	56,5	50	46	43
		+	67,8	61,4	60,8	60	56	45

Встановлено, що зі збільшенням концентрації досліджуваних антимікробних сполук, як у суміші, так і окремо, збільшується ступінь деструкції біоплівок, утворюваних дріжджами роду *Candida* (табл. 4.7). Так, за дії суміші ефірної олії кориці із ПАР, синтезованими за наявності індуктора у середовищі продуцента з очищеним гліцерином, у концентрації кожного з компонентів 125 – 500 мкг/мл вдалося досягти 100 % деструкції біоплівок *C. albicans* Д-6.

Така суміш в усьому досліджуваному діапазоні концентрацій продемонструвала вищий рівень деструкції біоплівок *C. albicans* Д-6, порівняно із показниками для ПАР та ефірної олії, використовуваних окремо в 1,1 – 1,2 та 1,2 – 1,6 разів відповідно. Однак за дії комплексу такої ефірної олії із ПАР (15,6 – 500 мкг/мл), утвореними на відходах виробництва біодизелю за внесення живих дріжджових клітин, ступінь руйнування біоплівок такої тест-культури знижувався, порівняно з використанням монопрепаратів ПАР та ефірної олії в 1,3 – 2,8 та 1,2 – 3,2 рази відповідно.

Встановили, що за дії суміші поверхнево-активних речовин, які було синтезовано за наявності дріжджового штаму БТМ-1 у середовищі з очищеним гліцерином, із ефірною олією кориці (15,6 – 500 мкг/мл) вдалося збільшити ступінь руйнування біоплівок *C. tropicalis* PE-2, порівняно із використанням кожного з препаратів окремо у 1,2 – 2,1 рази.

Аналогічні результати було одержано за використання ПАР, отриманих на відходах виробництва біодизелю за наявності еукаріотичного індуктора. Так, ступінь деструкції біоплівок відповідної тест-культури був вищим при застосування комплексного препарату таких ПАР та ефірної олії кориці (15,6 – 500 мкг/мл), порівняно із показниками, встановленими для монопрепаратів поверхнево-активних речовин та олії в 1,1 – 2,5 та 1,3 – 2,2 рази відповідно (табл. 4.8).

Таблиця 4.7

Ступінь деструкції біоплівки *C. albicans* Д-6, за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, ефірної олії кориці та їх суміші

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для біосинтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Ступінь деструкції біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія кориці	–	–	100	81,8	64,5	60,3	60,3	57,85
ПАР	Очищений	–	82	68,7	58,6	45,6	34,5	33,8
		+	92	84,2	80	83,5	73,5	68,4
	Відходи виробництва біодизелю	–	77,7	71,1	69,2	57,9	46,1	34,4
		+	100	100	92,6	69,4	60	51,2
ПАР+ефірна олія кориці	Очищений	–	86	70,4	62,7	50	41,2	34,5
		+	100	100	100	94,2	80	76,7
	Відходи виробництва біодизелю	–	70,2	60,7	50	30	19,4	14,6
		+	78,6	62,6	53,6	32,2	27,1	18,3

У доступних літературних джерелах не наявні дослідження щодо синергічної дії ефірних олій із мікробними вторинними метаболітами, синтезованими за участі біологічних індукторів, у деструкції біоплівки. Також майже не виявлено інформації щодо здатності суміші поверхнево-активних речовин із ефірними оліями до руйнування мікробних біоплівок. Однак є роботи, в яких представлено відомості про деструкцію біоплівок під дією ефірних олій, що використовувалися у суміші з антибіотиками (Rosato et al., 2020; Iseppi, Mariani, Benvenuti, Truzzi, & Messi, 2023; Miladi et al., 2017).

Дослідниками (Rosato et al., 2020) було встановлено синергічний ефект від використання сумішей ефірних олій кориці, м'яти перцевої та тимолу у комбінаціях із антибіотиками у руйнуванні бактеріальних біоплівок. Так, ступінь деструкції біоплівок бактеріального штаму *S. aureus* ATCC 29213 за дії оксациліну із ефірною олією м'яти перцевої або ефірної олії кориці був на 16,8 або 19,2% вищим відповідно, ніж за використання таких монопрепаратів. Комплексні препарати гентаміцину із ефірними оліями як м'яти перцевої, так і тимолу були ефективними проти біоплівок *S. aureus* Ig22, збільшуючи ступінь їх деструкції на 23,6 та 21,6% відповідно, порівняно з показниками, встановленими для монопрепаратів. За дії ефірної олії м'яти перцевої із оксациліном також вдалося збільшити ступінь руйнування біоплівок *S. epidermidis* IG4 на 22,8%.

У роботі (Iseppi, Mariani, Benvenuti, Truzzi, & Messi, 2023) було досліджено здатність до руйнування бактеріальних біоплівок за дії ефірної олії чайного дерева, антибіотиків цефотаксиму, ванкоміцину, оксациліну та їх суміші. Встановили, що при застосуванні комплексу ефірної олії чайного дерева (32 мкг/мл) та цефотаксиму (16 мкг/мл) або ванкоміцину (32 мкг/мл) ступінь деструкції *E. coli* 22BT або *E. faecalis* VAN3 підвищується на 40 або 47% відповідно, порівняно із використанням монопрепаратів даних антибіотиків. Також зазначається, що за дії суміші такої ефірної олії із оксациліном ступінь руйнування біоплівки *S. aureus* O є вищим на 50%, ніж при застосуванні лише антибіотику.

Таблиця 4.8

Руйнування біоплівки *C. tropicalis* PE-2, за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності живих клітин дріжджового індуктора, ефірної олії кориці та їх суміші

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для біосинтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія кориці	–	–	47	42,3	37	27	25,85	19,2
ПАР	Очищений	–	35,7	37	31,4	25	14	15,7
		+	46,5	39,1	35,4	35,1	33,8	28,5
	Відходи виробництва біодизелю	–	43,7	38,3	27	22	16,6	15,4
		+	55,1	41,2	33,2	23,8	25	17
ПАР+ефірна олія кориці	Очищений	–	54	48	42,2	35,5	26,3	19
		+	58	65,8	67,4	56	50	40
	Відходи виробництва біодизелю	–	60	50	47	36	21,4	18,2
		+	61,5	65,8	66,5	59,1	47,7	40

У дослідженні (Miladi et al., 2017) встановлено, що тимол, евгенол і карвакрол (основні антимікробні компоненти ефірної олії кмину) виявляють синергетичну дію з тетрацикліном у деструкції біоплівки штамів *S. aureus*. Показано, що біоплівка *S. aureus* В193 руйнувалася на 50% за використання тетрацикліну (12 мкг/мл), а також евгенолу, карваколу і тимолу при 250, 79 і 85 мкг/мл відповідно. Застосування суміші тетрацикліну із такими антимікробними сполуками продемонструвало такий же ступінь деградації біоплівки при значно нижчих концентраціях (6 мкг/мл для евгенолу та карваколу, 9 мкг/мл для тимолу).

Науковцями (Pirog, Kliuchka, Kliuchka, Shevchuk, & Iutynska, 2020) було виявлено, що ПАР, синтезовані як на середовищі з рафінованою, так і відпрацьованою соняшниковою олією, демонструють синергізм із ефірними оліями кориці та лемонграсу у руйнуванні дріжджових біоплівок. Використання такої суміші проти *C. albicans* D-6 та *C. tropicalis* RE-2 призвело до збільшення ступеня деструкції у 1,5–2 рази, порівняно зі значеннями, встановленими для монопрепаратів ефірних олій (20 мкг/мл) та ПАР (20 мкг/мл).

Отже, отримані результати підтверджують можливість синергізму ефірних олій із препаратами ПАР, одержаними під час росту ІМВ В-7241 на середовищі із гліцерином різної якості за попереднього внесення дріжджового індуктора, у боротьбі із мікробними біоплівками. Найвищих показників деструкції біоплівок *B. subtilis* БТ-2 вдалося досягти за дії достатньо низьких концентрацій суміші ефірної олії чайного дерева із ПАР, синтезованими за наявності дріжджів *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовищі як з очищеним гліцерином, так і відходами виробництва біодезелю. Так, за концентрації кожної з досліджуваних антимікробних сполук 15,6 – 31,25 мкг/мл ступінь руйнування бактеріальної тест-культури становив 94 – 100%.

4.3. Руйнування двовидових біоплівки за дії комплексу поверхнево-активних речовин з ефірними оліями

Відомо, що у природних умовах біоплівки існують у вигляді змішаного багатовидового консорціуму, який виявляє толерантність до несприятливих умов навколишнього середовища, а також високу резистентність до відомих антимікробних препаратів (Lin, Wang, Li, Zhou, & Yang, 2022). Тому на наступному етапі проводили дослідження здатності до деструкції подвійних біоплівки суміші ефірних олій із поверхнево-активними речовинами *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, одержаними за наявності живих клітин дріжджового індуктора у середовище із гліцерином різного ступеня очистки.

Так, у *табл. 4.9 – 4.11* висвітлено результати синергічної дії ефірної олії чайного дерева та ПАР, одержаних за внесення живих дріжджових клітин у середовище вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 із гліцерином різного ступеня очищення, у деструкції двовидових бактеріальних та бактеріально-дріжджових біоплівки. Встановлено, що за дії комплексу ПАР із такою ефірною олією вдалося підвищити ступінь руйнування подвійних біоплівки досліджуваних тест-культур, порівняно із використанням таких антимікробних препаратів окремо.

Встановили, що ступінь деструкції двовидових біоплівки *B. subtilis* БТ-2 і *S. aureus* БМС-1 за використання суміші ПАР, синтезованих за наявності клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовищі з очищеним гліцерином, із ефірною олією чайного дерева був вищим в 1,1 – 1,5 рази порівняно із використанням таких поверхнево-активних речовин окремо. Аналогічна закономірність була виявлена і для суміші ефірної олії із ПАР, одержаними на відходах виробництва біодизелю. Ступінь деструкції двовидової бактеріальної біоплівки за дії такої суміші в усьому досліджуваному діапазоні концентрацій був вищим у 1,1 – 1,3 рази, ніж відповідні показники, встановлені для монопрепаратів ПАР та лише в 1,1 раз, ніж для монопрепаратів ефірної олії у концентрації 15,6 – 125 мкг/мл (*табл. 4.9*).

Таблиця 4.9

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

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для біосинтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія чайного дерева	–	–	91	80,8	60,6	61,6	50	40,8
ПАР	Очищений	–	66,7	53,5	48,7	44,5	36,4	32,9
		+	55,6	51,5	48,6	50	44,6	37
	Відходи виробництва біодизелю	–	68,7	54,7	48,8	45	41,8	36
		+	70	62,5	53,5	50	43,6	37,7
ПАР+ефірна олія кориці	Очищений	–	72,7	62,6	51,5	47,5	42,6	32,6
		+	82,7	65,6	53,5	46,6	45,5	37,6
	Відходи виробництва біодизелю	–	100	83,8	62,6	50	48,5	43,4
		+	87	80,6	67,4	65,5	52,7	45,5

Примітка. Табл. 4.9 – 4.11: під час визначення ступеня деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5%.

Виявили, що за дії суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих у середовищі із гліцерином різної якості та наявності живих дріжджових клітин, та ефірної олії чайного дерева ступінь деструкції подвійної біоплівки *E. cloacae* С-8 і *P. vulgaris* ПА-12 поступово зростав зі збільшенням концентрації використовуваних антимікробних речовин (табл. 4.10). Так, при застосуванні даної суміші (15,6 – 500 мкг/мл), ступінь руйнування двовидової бактеріальної біоплівки був вищим, ніж за дії монопрепаратів ПАР в 1,1 – 1,6 разів. Використання комплексних препаратів ефірної олії чайного дерева із ПАР підвищило ступінь деструкції відповідної біоплівки порівняно зі встановленими показниками і для монопрепаратів ефірної олії в 1,1 – 1,8 разів.

Встановлено, що використання комплексу ефірної олії чайного дерева із ПАР, синтезованими за дії живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовищі з очищеним гліцерином, підвищувало ступінь руйнування двовидової біоплівки *B. subtilis* БТ-2 і *C. albicans* Д-6 в 1,1 – 1,7 разів, порівняно із дією монопрепаратів таких поверхнево-активних речовин (15,6 – 500 мкг/мл).

Аналогічні закономірності спостерігали і щодо дії суміші ефірної олії із ПАР, одержаними у середовищі із відходами виробництва біодизелю. Так, ступінь деструкції бактеріально-дріжджової біоплівки був вищим у 1,1 – 1,3 рази, ніж відповідний показник, встановлений для препаратів ПАР, що досліджувалися окремо. Використання суміші ефірної олії чайного дерева і ПАР, синтезованих як на очищеному гліцерині концентрацією 15,6 – 31,25 мкг/мл, так і на відходах виробництва біодизелю (15,6 – 125 мкг/мл), підвищувало ступінь деструкції досліджуваної біоплівки у 1,3 – 1,5 та 1,2 – 1,7 разів, порівняно із дією монопрепаратів ефірної олії (табл. 4.11).

Таблиця 4.10

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

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для біосинтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія чайного дерева	–	–	100	67,4	57	35	35	34,3
ПАР	Очищений	–	52,2	50	45,7	35	26	22
		+	67,4	56,5	50	39,1	43,4	40
	Відходи виробництва біодизелю	–	70	59	57,4	45,7	46,5	41
		+	70	63,5	60	55,2	48	43
ПАР+ефірна олія чайного дерева	Очищений	–	87	71,7	61	58,7	47,8	44,7
		+	100	84,8	74,3	62,6	54,8	50
	Відходи виробництва біодизелю	–	91,3	87	71,7	58,7	54,8	40
		+	100	74	67,4	60	55	43,5

Таблиця 4.11

Руйнування подвійної біоплівки *B. subtilis* БТ-2 і *C. albicans* Д-6, за дії ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності дріжджового індуктора, ефірної олії чайного дерева та їх суміші

Антимікробна сполука	Гліцерин як субстрат для біосинтезу ПАР	Наявність індуктора у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за дії, концентрацією (мкг/мл)					
			500	250	125	62,5	31,25	15,6
Ефірна олія чайного дерева	–	–	100	95	57	48,7	35,1	27
ПАР	Очищений	–	56	54,3	43,5	40,1	34,3	24,3
		+	65,1	56,2	50,1	47	40,5	23,5
	Відходи виробництва біодизелю	–	100	100	54	46	32,4	26
		+	97,3	84	56,8	52,4	44,1	39
ПАР+ефірна олія чайного дерева	Очищений	–	65	51,4	50	47	40,5	35
		+	100	73	56,7	49,1	44	40
	Відходи виробництва біодизелю	–	100	100	59,5	54,1	48,4	40
		+	98	86	75	60,5	50	45

У доступних наукових статтях відсутні дослідження, що стосуються синергічної дії ефірних олій із мікробними вторинними метаболітами, одержаними за участі біологічних індукторів, у деструкції двовидових біоплівки. Наявні лише поодинокі статті, в яких представлено інформацію про деструкцію біоплівки під дією ефірних олій, що використовувалися у суміші з антибіотиками (Budzyńska, Różalska, Sadowska, & Różalska, 2017; Maione et al., 2022).

Науковцями (Budzyńska, Różalska, Sadowska, & Różalska, 2017) було досліджено синергічний ефект ефірної олії гвоздики та антибіотиків флуконазолу і мупіроцину щодо руйнування двовидових біоплівки *S. aureus*/S. *aureus*. Встановили, що за дії суміші ефірної олії гвоздики із флуконазолом або із мупіроцином ступінь деструкції такої біоплівки складав 61,11 або 58,6 % відповідно, що було у 10 або 4 рази вищим, ніж за використання монопрепаратів даних антибіотиків. Також авторами зазначається, що за використання комплексу обох антибіотиків із ефірною олією гвоздики вдалося підвищити ступінь руйнування дріжджово-бактеріальної біоплівки у 4,5 рази, порівняно із дією суміші антибіотиків.

Дослідники (Maione et al., 2022), засвідчили можливість синергічного ефекту за використання міртенолу із каспофунгіном та меропенемом у боротьбі із бактеріально-дріжджовими біоплівками. Було встановлено, що міртенол – активний компонент ефірних олій мирту звичайного ефективно руйнує подвійну біоплівку, утворювану *S. aureus* та *Klebsiella pneumoniae* за ступенем деструкції 100%. За дії такого компоненту із каспофунгіном або меропенемом показник деструкції такої біоплівки був нижчим, ніж за використання монопрепарату міртенолу, але становив 80 %.

Отже, одержані у ході досліджень результати засвідчують можливість синергізму ефірної олії чайного дерева із препаратами ПАР, одержаними під час росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на середовищі із гліцерином різної якості за наявності дріжджового індуктора у вигляді живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1, у боротьбі із подвійними біоплівками. Стовідсоткового

руйнування двовидової біоплівки, утворюваної *E. cloacae* C-8 і *P. vulgaris* ПА-12, вдалося досягти за використання суміші таких ПАР із ефірною олією чайного дерева, у концентрації 500 мкг/мл кожного з антимікробних агентів.

ВИСНОВКИ

1. Внесення у середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 як з очищеним гліцерином, так і відходами виробництв а біодизелю живих, інактивованих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 і відповідного супернатанту супроводжувалося синтезом ПАР, антимікробна активність яких щодо бактеріальних і дріжджових тест-культур була у 9–162; 3–33 рази і 5–57 разів відповідно вищою порівняно з активністю поверхнево-активних речовин, утворених без індуктора.

2. Деструкція бактеріальних і дріжджових біоплівки після обробки розчинами ПАР (6,8–880 мкг/мл), синтезованих на гліцерині різної якості за наявності живих і інактивованих дріжджових клітин була на 0,3– 50 і 0,8–23,8% вищою, ніж показники, встановлені для препаратів, утворених без індуктора. У разі внесення супернатанту у середовище з відходами виробництва біодизелю спостерігали синтез ПАР, за дії яких ступінь руйнування біоплівки більшості тест-культур в усьому досліджуваному діапазоні концентрацій був на 2,7–44,3% вищим порівняно з таким для поверхнево-активних речовин, одержаних без індуктора. Максимальний ступінь деструкції біоплівки (88,2 – 100%) досягався за використання синтезованих за наявності індукторів ПАР концентрацією 55 – 220 мкг/мл.

3. Після обробки абіотичних поверхонь препаратами ПАР (11–88 мкг/мл), синтезованими за наявності живих, інактивованих клітин дріжджів і супернатанту адгезія бактеріальних і дріжджових тест-культур була на 1–71, 2– 59,5 і 2–65% нижчою, ніж за дії поверхнево-активних речовин, утворених без індуктора. Мінімальна адгезія (12 – 14%) на абіотичних поверхнях спостерігалася під впливом утворених за наявності індукторів ПАР концентрацією (44 – 88 мкг/мл).

4. У разі використання суміші ефірної олії чайного дерева з ПАР, синтезованими за внесення живих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 у середовище культивування IMB B-7241 з гліцерином різного ступеня очищення спостерігали зниження МІК щодо бактеріальних тест-культур поверхнево-

активних речовин та ефірної олії у 2,2–40 та 15–470 разів відповідно. Мінімальні інгібуючі концентрації щодо дріжджових тест-культур комплексу ефірної олії кориці з поверхнево-активними речовинами, синтезованими за наявності живих клітин індуктора, були нижчими у 400–960 та 2,5–5 разів відповідно порівняно з показниками, встановленими для монопрепаратів цих біоцидів.

5. За дії суміші ефірної олії чайного дерева або кориці з ПАР (15,6–500 мкг/мл), синтезованими на гліцерині різного ступеня очищення за наявності живих дріжджових клітин, деструкція біоплівки була в 1,1–4,2 рази вищою, ніж під впливом тільки ПАР, або тільки олії.

6. Деструкція двовидових бактеріально-бактеріальних і бактеріально-дріжджових біоплівок за дії комплексу ефірної олії чайного дерева з ПАР (15,6–500 мкг/мл), синтезованих за наявності індуктора, була в 1,1–1,8 разів вищою порівняно із використанням монопрепаратів ПАР чи ефірної олії.

7. Одержані результати засвідчують можливість суттєвого підвищення як антимікробної, так і антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у разі внесення у середовище культивування живих, інактивованих клітин *S. cerevisiae* БТМ-1 або відповідного супернатанту.

Список використаної літератури

1. Кухтин, М. Д., Перкій, Ю. Б., & Крушельницька, Н. В. (2013). Формування змішаних біоплівок мікроорганізмами, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого. *Ветеринарна медицина*, (97), 442-443.
2. Пирог, Т. П., Іванов, М. С., & Ярова, Г. А. (2020). Антимікробна активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів. *Наукові праці НУХТ*, 27(4), 43-52. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-4-6.
3. Пирог, Т. П., Никитюк, Л. В., Макієнко, В. О., Шевчук, Т. А., & Іутинська, Г. О. (2017). Регуляція антимікробної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405. *Мікробіологічний журнал*, 79 (3), 27-35.
4. Пирог, Т. П., Скроцька, О. І., & Шевчук, Т. А. (2020). Вплив біологічних індукторів на антимікробну, антиадгезивну активність та деструкцію біоплівки поверхнево-активними речовинами *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405. *Мікробіол. журн.*, 82, (3), 24 – 33.
5. Пирог, Т. П., Шевчук, Т. А., Петренко, Н. М., Палійчук, О. І., & Іутинська, Г. О. (2018). Вплив умов культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на властивості синтезованих поверхнево-активних речовин. *Мікробіол. журнал*, 84(4), 13-27. doi: 10.15407/microbiolj80.04.013.
6. Шинкарук, О. Ю., Кухтин, М. Д., Вічко, О. І., Швед, О. В., & Марінцова, Н. Г. (2018). Характеристика мийного засобу ензимий за здатністю руйнування мікробних біоплівок. *Вісник Національного університету Львівська політехніка. Хімія, технологія речовин та їх застосування*, (886), 158-164.

					НУХТ БТЕК 02.02.11 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	Літера	Аркш	Аркшів
Розробник	Парфенюк М.А.						109	109
Керівник	Пирог Т.П.							
Н. контр								
Консильт								
Зав. каф.	Стадніков В.П.					Кафедра БТМ		

7. Ait Dra, L., Ait Sidi Brahim, M., Boualy, B., Aghraz, A., Barakate, M., Oubaassine, S., ... Larhsini, M. (2017). Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products*, 109, 746–752. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.09.028.
8. Aleksic Sabo, V., Nikolic, I., Mimica-Dukic, N., & Knezevic, P. (2021). Anti-*Acinetobacter baumannii* activity of selected phytochemicals alone, in binary combinations and in combinations with conventional antibiotics. *Natural Product Research*, 35(24), 5964-5967. doi: 10.1080/14786419.2020.1808635.
9. 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. doi: 10.1111/lam.13169.
10. Angiolella, L. (2021). Synergistic activity of *Pelargonium capitatum* and *Cymbopogon martini* essential oils against *C. albicans*. *Natural Product Research*, 35(24), 5997-6001. doi:10.1080/14786419.2020.1810037.
11. Aparicio, J. F., Barreales, E. G., Payero, T. D., Vicente, C. M., de Pedro, A., & Santos-Aberturas, J. (2016). Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: biosynthesis and its regulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(1), 61-78. doi: 10.1007/s00253-015-7077-0.
12. Ariana, M., & Hamedi, J. (2017). Enhanced production of nisin by co-culture of *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis* and *Yarrowia lipolytica* in molasses based medium. *Journal of biotechnology*, 256, 21-26. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.07.009.
13. 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. doi: 10.1186/s12866-023-02797-x.
14. Atakpa, E. O., Zhou, H., Jiang, L., Ma, Y., Liang, Y., Li, Y., ... & Zhang, C. (2022). Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture

of fungi and biosurfactant-producing bacteria. *Chemosphere*, 290, 133337. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133337.

15. Assaw, S., Mohd Amir, M. I. H., Khaw, T. T., Bakar, K., Mohd Radzi, S. A., & Mazlan, N. W. (2020). Antibacterial and antioxidant activity of naphthofuranquinones from the twigs of tropical mangrove *Avicennia officinalis*. *Natural product research*, 34(16), 2403-2406. doi: 10.1080/14786419.2018.1538220.

16. 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. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136864.

17. Benoit, I., van den Esker, M. H., Patyshakuliyeva, A., Mattern, D. J., Blei, F., Zhou, M., ... & Kovács, Á. T. (2015). *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environmental microbiology*, 17(6), 2099-2113. doi: 10.1111/1462-2920.12564.

18. Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol. Adv.* 32, 1180–1204. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.03.001.

19. 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. doi: 10.1139/o59-099.

20. Boruta, T. (2021). A bioprocess perspective on the production of secondary metabolites by *Streptomyces* in submerged co-cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(10), 171. doi: 10.1007/s11274-021-03141-z.

21. Boruta, T., & Ścigaczewska, A. (2021). Enhanced oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in submerged co-cultures with *Streptomyces noursei*. *Molecules*, 26(19), 6036. doi: 10.3390/molecules26196036.

22. Boruta, T., Ścigaczewska, A., & Bizukojć, M. (2021). “Microbial wars” in a stirred tank bioreactor: Investigating the co-cultures of *Streptomyces rimosus* and *Aspergillus terreus*, filamentous microorganisms equipped with a rich arsenal of secondary metabolites. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 713639. doi: 10.3389/fbioe.2021.713639.
23. Boruta, T., Ścigaczewska, A., & Bizukojć, M. (2022). Production of secondary metabolites in stirred tank bioreactor co-cultures of *Streptomyces noursei* and *Aspergillus terreus*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. doi: 10.3389/fbioe.2022.1011220.
24. 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. doi:10.1007/s11046-017-0192-y.
25. Callow, N. V., Ray, C. S., Kelbly, M. A., & Ju, L. K. (2016). Nutrient control for stationary phase cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and microbial technology*, 82, 8-14. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.08.012.
26. Cardoso, N. N. R., Alviano, C. S., Blank, A. F., Romanos, M. T. V., Fonseca, B. B., Rozental, S., & Alviano, D. S. (2016). Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–12. doi: 10.1155/2016/5647182.
27. Ceresa, C., Fracchia, L., Fedeli, E., Porta, C., & Banat, I. M. (2021). Recent advances in biomedical, therapeutic and pharmaceutical applications of microbial surfactants. *Pharmaceutics*, 13(4), 466. doi: 10.3390/pharmaceutics13040466.
28. Ceresa, C., Rinaldi, M., Tessarolo, F., Maniglio, D., Fedeli, E., Tambone, E., ... & Fracchia, L. (2021). Inhibitory effects of lipopeptides and glycolipids on *C. albicans*–*Staphylococcus* spp. dual-species biofilms. *Frontiers in microbiology*, 11, 545654. doi: 10.3389/fmicb.2020.545654.

29. 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. doi: 10.4103/phrev.phrev_21_17.
30. Chen, W., Wang, M., Gong, Y., Deng, Q., Zheng, M., Chen, S., ... & Huang, F. (2021). The unconventional adverse effects of fungal pretreatment on iturin A fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens* CX-20. *Microbial Biotechnology*, 14(2), 587-599. doi: 10.1111/1751-7915.13658.
31. Chen, X. Y., Sun, H. Z., Qiao, B., Miao, C. H., Hou, Z. J., Xu, S. J., ... & 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. doi: 10.1016/j.biortech.2022.126863.
32. Chevrette, M. G., Thomas, C. S., Hurley, A., Rosario-Meléndez, N., Sankaran, K., Tu, Y., ... & Handelsman, J. (2022). Microbiome composition modulates secondary metabolism in a multispecies bacterial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(42), e2212930119. doi: 10.1073/pnas.2212930119.
33. da Silva, A. R. S., de Souza de Azevedo, P. O., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2022). Cultivation of Lactic Acid Bacteria and Evaluation of the Antimicrobial Potential of Partially Purified Bacteriocin-like Inhibitory Substances against Cariogenic and Food Pathogens. *Fermentation*, 8(8), 400. doi: 10.3390/fermentation8080400.
34. DeFilippi, S., Groulx, E., Megalla, M., Mohamed, R., & Avis, T. J. (2018). Fungal competitors affect production of antimicrobial lipopeptides in *Bacillus subtilis* strain B9–5. *Journal of chemical ecology*, 44, 374-383. doi: 10.1007/s10886-018-0938-0.
35. De Oliveira, D. W. F., Cara, A. B., Lechuga-Villena, M., García-Román, M., Melo, V. M. M., Gonçalves, L. R. B., & Vaz, D. A. (2016). Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56.

Journal of Environmental Science and Health, Part A, 52 (2), 174–181. doi: 10.1080/10934529.2016.1240491.

36. Ding, L., Guo, W., & Chen, X. (2019). Exogenous addition of alkanolic acids enhanced production of antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Pc3. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 5367-5377. doi: 10.1007/s00253-019-09792-1.

37. El Atki, Y., Aouam, I., El Kamari, F., Taroq, A., Nayme, K., Timinouni, M., ... & Abdellaoui, A. (2019). Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 10(2), 63. doi: 10.4103/japtr.JAPTR_366_18.

38. Essid, R., Hammami, M., Gharbi, D., Karkouch, I., Hamouda, T. B., Elkahoui, S., & Tabbene, O. (2017). Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(18), 6993–7006. doi: 10.1007/s00253-017-8442-y.

39. Feudjieu, E. G., Kemegne, G. A., Tchinda, F. C., Tchamgoue, D. A., Ndedi, E. D. F. M., Matchuenkam, G. S., & Agbor, G. A. (2023). Synergistic Effects of Essential Oils and Antibiotics Against Some Bacterial Strains. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 13(6), 73-82. doi: 10.22270/jddt.v13i6.5860.

40. 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. doi: 10.3390/microorganisms10051059.

41. Galdiero, E., Ricciardelli, A., D'Angelo, C., de Alteriis, E., Maione, A., Albarano, 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. doi: 10.1016/j.resmic.2021.103880.

42. Gan, C., Langa, E., Valenzuela, A., Ballesteros, D., & Pino-Otín, M. R. (2023). Synergistic Activity of Thymol with Commercial Antibiotics against Critical and High WHO Priority Pathogenic Bacteria. *Plants*, 12(9), 1868. doi: 10.3390/plants12091868.
43. Gomes, M. Z. D. V., & Nitschke, M. (2011). Evaluation of rhamnolipids surfactants as agents to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polystyrene surfaces. Proceedings iCEF; food process engineering in a changing world. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012, 49(1): 960 – 5.
44. 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. doi: 10.3389/fmicb.2016.00863.
45. 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. doi: 10.1111/lam.13069.
46. 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. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.039.
47. 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. doi: 10.1016/j.enzmictec.2018.03.008.
48. Haque, M. U., Rahman, M. A., Haque, M. A., Sarker, A. K., & Islam, M. A. U. (2016). Antimicrobial and anticancer activities of ethyl acetate extract of co-culture of *Streptomyces* sp. ANAM-5 and AIAH-10 isolated from mangrove

forest of Sundarbans, Bangladesh. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(2), 051-055. doi: 10.7324/JAPS.2016.60207.

49. Hays, S. G., Patrick, W. G., Ziesack, M., Oxman, N., & Silver, P. A. (2015). Better together: engineering and application of microbial symbioses. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 40–49. doi:10.1016/j.copbio.2015.08.008.

50. Hifnawy, M. S., Hassan, H. M., Mohammed, R., M. Fouda, M., Sayed, A. M., Hamed, A. A., ... & Abdelmohsen, U. R. (2020). Induction of antibacterial metabolites by co-cultivation of two red-sea-sponge-associated actinomycetes *Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinespora* sp. EG49. *Marine Drugs*, 18(5), 243. doi: 10.3390/md18050243.

51. Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*, 21(12), e51034. doi: 10.15252/embr.202051034.

52. 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. doi: 10.3390/antibiotics12050846.

53. 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*, 28(4), 1671. doi: 10.3390/molecules28041671.

54. Kamyabi, A., Nouri, H., & Moghimi, H. (2017). Synergistic effect of *Sarocladium* sp. and *Cryptococcus* sp. co-culture on crude oil biodegradation and biosurfactant production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 182, 324-334. doi: 10.1007/s12010-016-2329-8.

55. Khalil, Z. G., Cruz-Morales, P., Licon-Cassani, C., Marcellin, E., & Capon, R. J. (2019). Inter-Kingdom beach warfare: Microbial chemical communication activates natural chemical defences. *The ISME journal*, 13(1), 147-158. doi: 10.1038/s41396-018-0265-z.

56. Khalil, Z. G., Kalansuriya, P., & Capon, R. J. (2014). Lipopolysaccharide (LPS) stimulation of fungal secondary metabolism. *Mycology*, 5(3), 168-178. doi: 10.1080/21501203.2014.930530.
57. Li, T., Tang, J., Karuppiah, V., Li, Y., Xu, N., & Chen, J. (2020). Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. *Biological Control*, 140, 104122. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104122.
58. Li, X. P., Zhou, L. L., Guo, Y. H., & Wang, J. W. (2021). The signaling role of extracellular ATP in co-culture of *Shiraia* sp. S9 and *Pseudomonas fulva* SB1 for enhancing hypocrellin A production. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-15. doi: 10.1186/s12934-021-01637-9.
59. 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. doi: 10.1128/aem.01482-22.
60. Liu, W., Wang, J., Li, S., Zhang, H., Meng, L., Liu, L., ... & Ping, W. (2022). Genomic and biocontrol potential of the crude lipopeptide by *Streptomyces bikiniensis* HD-087 against *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Microbiology*, 1946. doi: 10.3389/fmicb.2022.888645.
61. Liu, W., Wang, J., Zhang, H., Qi, X., & Du, C. (2022). Transcriptome analysis of the production enhancement mechanism of antimicrobial lipopeptides of *Streptomyces bikiniensis* HD-087 by co-culture with *Magnaporthe oryzae* Guy11. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1-11. doi: 10.1186/s12934-022-01913-2.
62. Liwarska-Bizukojc, E., Olejnik, D., Delbeke, E. I. P., Van Geem, K. M., & Stevens, C. V. (2018). Evaluation of biological properties and fate in the environment of a new class of biosurfactants. *Chemosphere*, 200, 561–568. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.145.
63. Lu, D., Ma, Z., Xu, X., & Yu, X. (2016). Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium oxysporum* f. sp.

cucumerinum. *Journal of basic microbiology*, 56(8), 929-933. doi: 10.1002/jobm.201500666.

64. Luti, K. J. K., & Yonis, R. W. (2013). Elicitation of *Pseudomonas aeruginosa* with live and dead microbial cells enhances phenazine production. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(6), 8769-8778.

65. 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.

66. Maglangit, F., Fang, Q., Kyeremeh, K., Sternberg, J. M., Ebel, R., & Deng, H. (2020). A co-culturing approach enables discovery and biosynthesis of a bioactive indole alkaloid metabolite. *Molecules*, 25 (2), 256. doi: 10.3390/molecules25020256.

67. Maimone, N. M., de Oliveira, L. F. P., Santos, S. N., & de Lira, S. P. (2021). Elicitation of *Streptomyces lunalinharesii* secondary metabolism through co-cultivation with *Rhizoctonia solani*. *Microbiological Research*, 251, 126836. doi: 10.1016/j.micres.2021.126836.

68. 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. doi: 10.3390/microorganisms10091773.

69. 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. *Mar. Drugs*, 12, 1043–1065. doi: 10.3390/md12021043.

70. Meschke, H., Walter, S., & Schrempf, H. (2012). Characterization and localization of prodiginines from *Streptomyces lividans* suppressing *Verticillium dahliae* in the absence or presence of *Arabidopsis thaliana*. *Environmental microbiology*, 14(4), 940-952. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02665.x.

71. Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Bakhrouf, A., Chaabouni, Y., ... & Chaieb, K. (2017). Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microbial pathogenesis*, 112, 156-163. doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.057.
72. Mohamed, R., Groulx, E., Defilippi, S., Erak, T., Tambong, J. T., Tweddell, R. J., ... & Avis, T. J. (2017). Physiological and molecular characterization of compost bacteria antagonistic to soil-borne plant pathogens. *Canadian journal of microbiology*, 63(5), 411-426. doi: 10.1139/cjm-2016-0599.
73. 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. doi: 10.1111/jam. 13755.
74. Moussa, M., Ebrahim, W., Kalscheuer, R., Liu, Z., & Proksch, P. (2020). Co-culture of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* with the fungus *Fusarium tricinctum* induces bacterial antifungal and quorum sensing signaling molecules. *Phytochemistry Letters*, 36, 37-41. doi: 10.1016/j.phytol.2020.01.013.
75. Moussaoui, F., & Alaoui, T. (2016). Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 32-37. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.09.024.
76. Nurulita, Y., Yuharmen, Fitri, A., Khairullinas, Hardiyanti, C., Shar, S. S., & Nugroho, T. T. (2020). Biotic elicitor, *Staphylococcus aureus*, stimulated antibiotics production from a local fungus of tropical peat swamp soil, *Penicillium* sp. LBKURCC34. *The 8th International Conference of the Indonesian Chemical Society (ICICS) 2019*. doi: 10.1063/5.0002038.
77. 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. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103806.

78. Ola, A. R., Thomy, D., Lai, D., Brötz-Oesterhelt, H., & Proksch, P. (2013). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of natural products*, 76(11), 2094-2099. doi:10.1021/np400589h.

79. Olfa, T., Antonio, D. G., Sana, A., Imen, B. S., Salem, E., Mohamed Najib, A., ... & Maria Luisa, M. (2015). Synergistic fungicidal activity of the lipopeptide bacillomycin D with amphotericin B against pathogenic *Candida* species. *FEMS Yeast Research*, 15(4), fov022. doi: 10.1093/femsyr/fov022.

80. Özel, Y., Yılmaz, U., & Ünlü, M. (2022). Antibacterial activity and synergistic interaction of various essential oil components and antibiotics. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 56(1), 95-102. doi: 10.5578/mb.20229908.

81. Pan, F. D., Liu, S., Xu, Q. M., Chen, X. Y., & Cheng, J. S. (2021). Bioconversion of kitchen waste to surfactin via simultaneous enzymolysis and fermentation using mixed-culture of enzyme-producing fungi and *Bacillus amyloliquefaciens* HM618. *Biochemical Engineering Journal*, 172, 108036. doi: 10.1016/j.bej.2021.108036.

82. 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*, 11(8), 821. doi: 10.3390/pathogens11080821.

83. Pirog, T., & Ivanov, M. (2022). Destruction of biofilms by surfactants synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 in the presence of competitive microorganisms. *Ukrainian Food Journal*, 291.

84. Pirog, T., & Ivanov, M. (2022). Influence of biological inductors on the anti-adhesive activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants. *Scientific Works of NUFT*, 28 (4), 36 – 46. doi: 10.24263/2225-2924-2022-28-4-5.

85. Pirog, T., Kliuchka, I., & Kliuchka, L. (2022). Influence of inactivated cells of competitive microorganisms on the biological activity of *Rhodococcus*

erythropolis IMV AC-5017 surfactants. *Редакційна колегія*, 28 (2), 24 – 35. doi: 10.24263/2225-2924-2022-28-2-4.

86. Pirog, T., Kliuchka, L., Kliuchka, I., Antoniuk, S., Bakhtii, O., & Zhaliuk, D. (2020). Synergism of the antimicrobial activity of the mixture of *Rhodococcus erythropolis* IMV AC-5017 surfactants with other biocidal compounds. *Scientific Works of NUFT 2020*, 26(5), 17 – 25. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-5-4.

87. 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. *Microbiological Journal/Mikrobiolohichni Zhurnal*, 82(4). doi: 10.15407/microbiolj82.04.031.

88. Pirog, T., Kluchka, L., Skrotska, O., & Stabnikov, V. (2020). The effect of co-cultivation of *Rhodococcus erythropolis* with other bacterial strains on biological activity of synthesized surface-active substances. *Enzyme and Microbial Technology*, 142, 109677. doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109677.

89. Pirog, T. P., Konon, A. D., Beregovaya, K. A., & Shulyakova, M. A. (2014). Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Microbiology*, 83(6), 732–739. doi: 10.1134/S0026261714060150.

90. Pirog, T. P., Savenko, I. V., Shevchuk, T. A., Krutous, N. V., & Iutynska, G. O. (2016). Antimicrobial Properties Surfactants Synthesized under Different Cultivation Conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* EMV B-7241. *Mikrobiolohichni Zhurnal*, 78(3), 2-12.

91. Pirog, T., Shulyakova, M., Sofilkanych, A., Shevchuk, T., & Mashchenko, O. (2015). Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *Food and Bioproducts Processing*, 93, 11-18. doi: 10.1016/j.fbp.2013.09.003.

92. Priya, A., Mandal, A. K., Ball, A. S., Manefield, M., Lal, B., & Sarma, P. M. (2015). Mass culture strategy for bacterial yeast co-culture for degradation of petroleum hydrocarbons in marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 191-199. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.08.050.
93. 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. doi: 10.2174/1389201020666191205115008.
94. Rateb, M. E., Hallyburton, I., Houssen, W. E., Bull, A. T., Goodfellow, M., Santhanam, R., ... & Ebel, R. (2013). Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *Rsc Advances*, 3(34), 14444-14450.
95. Rosato, A., Sblano, S., Salvagno, L., Carocci, A., Clodoveo, M. L., Corbo, F., & Fracchiolla, G. (2020). Anti-Biofilm Inhibitory Synergistic Effects of Combinations of Essential Oils and Antibiotics. *Antibiotics*, 9(10), 637. doi:10.3390/antibiotics9100637.
96. Sepahvand, R., Delfan, B., Ghanbarzadeh, S., Rashidipour, M., Veiskarami, G. H., & Ghasemian-Yadegari, J. (2014). Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of *Salvia sclareoides*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S491-S496. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60280-7.
97. Sharifzadeh, A., Khosravi, A. R., Shokri, H., & Tari, P. S. (2017). Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. *Microbial pathogenesis*, 107, 390-396. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.021.
98. Sharma, R., Jamwal, V., Singh, V. P., Wazir, P., Awasthi, P., Singh, D., ... & Chaubey, A. (2017). Revelation and cloning of valinomycin synthetase genes in *Streptomyces lavendulae* ACR-DA1 and their expression analysis under

different fermentation and elicitation conditions. *Journal of biotechnology*, 253, 40-47. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.05.008.

99. Sheppard, P. J., Simons, K. L., Adetutu, E. M., Kadali, K. K., Juhasz, A. L., Manefield, M., ... & Ball, A. S. (2014). The application of a carrier-based bioremediation strategy for marine oil spills. *Marine pollution bulletin*, 84(1-2), 339-346. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.03.044.

100. Shi, S., Tao, Y., & Liu, W. (2018). Effects of Fungi Fermentation Broth on Natamycin Production of *Streptomyces*. *Progress in Applied Microbiology*, 1(1). Song, Z., Ma, Z., Bechthold, A., Yu, X. (2020). Effects of addition of elicitors on rimocidin biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M527. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 4445-4455. doi:10.1007/s00253-020-10565-4.

101. Sun, Y., Liu, W. C., Shi, X., Zheng, H. Z., Zheng, Z. H., Lu, X. H., ... & Dong, Y. S. (2021). Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-16. doi: 10.1186/s12934-021-01527-0.

102. Sun, Y., Shi, X., Xing, Y., Ren, X. X., Zhang, D. Y., Li, X., ... & Dong, Y. S. (2022). Co-culture of *Aspergillus sydowii* and *Bacillus subtilis* induces the production of antibacterial metabolites. *Fungal Biology*, 126(4), 320-332. doi: 10.1016/j.funbio.2022.01.002.

103. Sung, A., Gromek, S., & Balunas, M. (2017). Upregulation and Identification of Antibiotic Activity of a Marine-Derived *Streptomyces* sp. via Co-Cultures with Human Pathogens. *Marine Drugs*, 15(8), 250. doi:10.3390/md15080250.

104. Tan, Z. Q., Leow, H. Y., Lee, D. C. W., Karisnan, K., Song, A. A. L., Mai, C. W., ... & Lai, K. S. (2019). Co-culture systems for the production of secondary metabolites: Current and future prospects. *The Open Biotechnology Journal*, 13 (1), 18 – 26. doi: 10.2174/1874070701913010018.

105. Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1315. doi: 10.3389/fmicb.2018.01315.
106. Ueda, K., Beppu, T. (2016). Antibiotics in microbial coculture. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 361–365. doi:10.1038/ja.2016.127.
107. Vitanza, L., Maccelli, A., Marazzato, M., Scazzocchio, F., Comanducci, A., Fornarini, S., ... Longhi, C. (2018). *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microbial Pathogenesis*, 126, 323-331. doi:10.1016/j.micpath.2018.11.025.
108. Wakefield, J., Hassan, H. M., Jaspars, M., Ebel, R., & Rateb, M. E. (2017). Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1284. doi: 10.3389/fmicb.2017.01284.
109. Wang, D., Wei, L., Zhang, Y., Zhang, M., & Gu, S. (2017). Physicochemical and microbial responses of *Streptomyces natalensis* HW-2 to fungal elicitor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 6705-6712. doi: 10.1007/s00253-017-8440-0.
110. 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. doi: 10.1007/s00253-013-4786-0.
111. Wang, M., Yang, C., François, J. M., Wan, X., Deng, Q., Feng, D., ... & 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*, 975. doi: 10.3389/fbioe.2021.735714.
112. Wang, X. F., Miao, C. H., Qiao, B., Xu, S. J., & Cheng, J. S. (2022). Co-culture of *Bacillus amyloliquefaciens* and recombinant *Pichia pastoris* for utilizing kitchen waste to produce fengycins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 133(6), 560-566. doi: 10.1016/j.jbiosc.2022.02.009.

113. Wang, Y., Wang, L., Zhuang, Y., Kong, F., Zhang, C., & Zhu, W. (2014). Phenolic polyketides from the co-cultivation of marine-derived *Penicillium* sp. WC-29-5 and *Streptomyces fradiae* 007. *Marine Drugs*, 12(4), 2079-2088. doi: 10.3390/md12042079.
114. Wu, Q., Ni, M., Dou, K., Tang, J., Ren, J., Yu, C., & Chen, J. (2018). Co-culture of *Bacillus amyloliquefaciens* ACCC11060 and *Trichoderma asperellum* GDFS1009 enhanced pathogen-inhibition and amino acid yield. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-12. doi: 10.1186/s12934-018-1004-x.
115. Wu, Z., Huang, Y., Li, Y., Dong, J., Liu, X., & Li, C. (2019). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* via induction of the defense mechanism and antimicrobial compounds produced by *Bacillus subtilis* SL-44 on pepper (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Microbiology*, 10, 2676. doi: 10.3389/fmicb.2019.02676.
116. Yu, M., Li, Y., Banakar, S. P., Liu, L., Shao, C., Li, Z., & Wang, C. (2019). New metabolites from the co-culture of marine-derived actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and fungus *Rhinocladiella similis* 35. *Frontiers in Microbiology*, 10, 915. doi: 10.3389/fmicb.2019.00915.
117. Yuan, X., Zhang, X., Chen, X., Kong, D., Liu, X., & Shen, S. (2018). Synergistic degradation of crude oil by indigenous bacterial consortium and exogenous fungus *Scedosporium boydii*. *Bioresource technology*, 264, 190-197. doi: 10.1016/j.biortech.2018.05.072.
118. Zawawi, M. A., Rosdi, N. I., Mazlan, N. W., Taib, M., Bakar, K., Zin, N. M., ... & Edrada-Ebel, R. (2022). Elicitation of induced polyketide compounds from a co-culture between *Streptomyces* sp. strain SUK10 and *Fusarium* sp. and their antibacterial activities. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 26(1), 96-108.
119. Zhang, L., Niaz, S. I., Khan, D., Wang, Z., Zhu, Y., Zhou, H., ... & Liu, L. (2017). Induction of diverse bioactive secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Trichoderma* sp. (strain 307) by co-cultivation with

Acinetobacter johnsonii (strain B2). *Marine drugs*, 15(2), 35. doi: 10.3390/md15020035.

120. Zhang, L., Niaz, S. I., Wang, Z., Zhu, Y., Lin, Y., Li, J., & Liu, L. (2018). α -Glucosidase inhibitory and cytotoxic botryorhodines from mangrove endophytic fungus *Trichoderma* sp. 307. *Natural product research*, 32(24), 2887-2892. doi: 10.1080/14786419.2017.1385023.

121. Zhang, X., Kong, D., Liu, X., Xie, H., Lou, X., & Zeng, C. (2021). Combined microbial degradation of crude oil under alkaline conditions by *Acinetobacter baumannii* and *Talaromyces* sp. *Chemosphere*, 273, 129666. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129666.

122. Zhang, W., Liu, H., Li, X., Liu, D., Dong, X. T., Li, F. F., ... & Yuan, Y. J. (2017). Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Engineering in Life Sciences*, 17(9), 1021-1029. doi: 10.1002/elsc.201700039.

123. Zhao, Y. F., Lu, D. D., Bechthold, A., Ma, Z., & Yu, X. P. (2018). Impact of *otrA* expression on morphological differentiation, actinorhodin production, and resistance to aminoglycosides in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 19(9), 708. doi: 10.1631/jzus.B1800046.

124. Zhi, Y., Wu, Q., & Xu, Y. (2017). Production of surfactin from waste distillers' grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresource Technology*, 235, 96–103. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.090.

ДОДАТКИ

Апробація результатів науково-дослідної роботи

Нагороди:

1. I місце на Всеукраїнському конкурсі студентських наукових робіт зі спеціальності «Біотехнології та біоінженерія» (місце проведення – Національний університет харчових технологій): секція «Промислова та екологічна біотехнологія». «Вплив конкурентних еукаріотичних мікроорганізмів на біологічну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241».

2. Переможець студентських наукових проектів за благодійної підтримки Корпорації «Артеріум» (29 червня 2022 р.).

Статті у журналі «Наукові праці НУХТ»:

1. Пирог Т. П., & Парфенюк М. А. (2023). Вплив конкурентних еукаріотичних мікроорганізмів на синтез та властивості вторинних метаболітів. Частина 1. Мікроміцети як регулятори синтезу та біологічної активності вторинних метаболітів. *Наукові праці НУХТ*, 29(3), 33—49. doi: 10.24263/2225-2924-2023-29-3-5.

2. Пирог, Т. П., & Парфенюк, М. А. (2023). Вплив конкурентних еукаріотичних мікроорганізмів на синтез та властивості вторинних метаболітів. Частина 2. Дріжджі як регулятори синтезу та біологічної активності вторинних метаболітів. *Наукові праці НУХТ*, 29(4), 50—60. doi: 10.24263/2225-2924-2023-29-4-6.

Тези у збірниках всеукраїнських конференцій:

1. Парфенюк М. А. Вплив дріжджових індукторів на здатність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 руйнувати біоплівки // XVI Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, КПІ, 3 червня 2022 р.) – С. 93.

Тези у збірниках студентських конференцій НУХТ:

1. Парфенюк М., Пирог Т. Вплив дріжджів на антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 // Матеріали 88 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, травень 2022 р.) ч. 1. – С. 319.

2. Парфенюк М., Іванов М., Пирог Т. Вплив дріжджів роду *Saccharomyces* на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 // Матеріали 89 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, 3-7 квітня 2023 р.). – С. 418.

3. Парфенюк М.А., Іванов М.С., Пирог Т.П. *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1 як індуктор синтезу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 з високою антимікробною активністю // Програма та тези матеріалів ХІ Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (м. Київ, 8 листопада 2022 р.). – С. 39-40.

4. Парфенюк М.А., Ключка І.В., Ключка Л.В., Пирог Т.П. Синергізм антифунгальної активності комплексу ефірних олій і поверхнево-активних речовин *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241, синтезованих за наявності *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* БТМ-1 // Матеріали ХІІ Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (м. Київ, 7 листопада 2023 р.). – С. 49-51.

Тези у збірниках міжнародних конференцій:

1. Парфенюк М. А., Пирог Т. П. Дріжджі як індуктори синтезу мікробних поверхнево-активних речовин з високою антимікробною та антиадгезивною активністю // ІІ Міжнародна науково-практична інтернет-

конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології (м. Харків, 20 травня 2022 р.) – С. 194-195.

2. Парфенюк М.А., Іванов М.С., Пирог Т.П. Вплив дріжджів роду *Saccharomyces* на антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 // Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, 13 жовтня 2022 р.). – С. 173-175.

3. Парфенюк М.А., Іванов М.С., Пирог Т.П. Вплив *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1 на здатність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 руйнувати біоплівки // Матеріали III міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 24 березня 2023 р.). – С. 302-303.

4. Іванов М. С., Парфенюк М. А., Пирог Т. П. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності дріжджів роду *Saccharomyces* // Сучасні досягнення фармацевтичної технології: матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фармацевт. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича (м. Харків, 10-11 травня 2023 р.) – Харків: НФаУ, 2023. – С. 74-75.

5. Парфенюк М.А., Іванов М.С., Пирог Т.П. Деструкція біоплівок під впливом поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності *Saccharomyces cerevisiae* БТМ-1// «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XVII Міжнародної науково-практичної конференції (Київ, 19, травня 2023 р.). – С. 157-158.

6. Parfeniuk M.A., Ivanov M.S., Pirog T.P. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* BTM-1 on the antiadhesive activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants // «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування»: матеріали міжнародної наукової конференції (м. Харків, 27-28 квітня 2023 р.) – С. 46 -47.

7. Парфенюк М.А., Іванов М.С., Пирог Т.П. Дріжджі роду *Saccharomyces* як індуктор синтезу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 з високою антибактеріальною активністю// «Хімія, біотехнологія, екологія та освіта»: Збірник матеріалів VII Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (м. Полтава, 17-18 травня 2023 р.). – С. 43 - 45.

8. Парфенюк М.А., Ключка І.В., Ключка Л.В., Пирог Т.П. Антибактеріальна активність суміші ефірних олій з поверхнево-активними речовинами, синтезованими *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності дріжджів роду *Saccharomyces* // Збірник матеріалів XI Міжнародної науково-практичної конференції «Хімія, біо- і фармтехнології, екологія та економіка в харчовій, косметичній та фармацевтичній промисловості» (18–19 листопада 2023 р., Харків: НТУ «ХПІ»). С. 50-51.

9. Ivanov M.S., Parfeniuk M.A., Pirog T.P. Antifungal activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants synthesized in the presence of biological inductors // Abstract book of the International Scientific and Practical Conference “Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post-war period” (15 -16 november 2023, Kyiv). – Kyiv, 2023. – С. 85 - 86.

Тези у збірниках школи молодих науковців АТ «Фармак»:

1. Парфенюк М.А., Іванов М.С., Пирог Т.П. Вплив еукаріотичних індукторів на антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 // Збірник матеріалів X науково-практичної конференції з міжнародною участю школи молодих науковців АТ «Фармак» «Наука та сучасне фармацевтичне виробництво» (м. Київ, 27-28 жовтня 2022 р.). – С. 60-61.