

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології**

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

на тему: «Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на антимікробну та антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241»

Виконала: здобувачка II курсу, групи 1

БЛАГОДИР Дар'я Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ПИРОГ Тетяна Павлівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Ольга ПЕРЕГІНЯ

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач

(підпис)

Київ – 2024 р.

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 «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 07 ” жовтня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БЛАГОДИР Дар'ї Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи « Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на антимікробну та антиадгезивну активність 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 07 жовтня 2024 року №875-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 20.11.2024

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241; цільовий продукт: поверхнево-активні речовини (ПАР); біологічний індуктор: *Enterobacter cloacae*.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Шляхи використання відходів виробництва біодизелю. РОЗДІЛ 2. Мікробні технології на основі відходів виробництва біодизелю. РОЗДІЛ 3. Матеріали і методи досліджень. РОЗДІЛ 4. Бактерії роду *Enterobacter* як фактор регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241. РОЗДІЛ 5. Синергізм біологічної активності суміші ефірної олії та поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності конкурентних бактерій роду *Enterobacter*.

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 07 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Пошук літератури для написання розділу 1	07.10.24-15.10.24	
2.	Шляхи використання відходів виробництва біодизелю	16.10.24-20.10.24	
3.	Мікробні технології на основі відходів виробництва біодизелю	21.10.24-25.10.24	
4.	Матеріали і методи досліджень	26.10.24-29.10.24	
5.	Бактерії роду <i>Enterobacter</i> як фактор регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB В-7241.	30.10.24-07.11.24	
6.	Синергізм біологічної активності суміші ефірної олії та поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB В-7241, синтезованих за наявності конкурентних бактерій роду <i>Enterobacter</i>	08.11.24-12.11.24	
7.	Оформлення пояснювальної записки	13.11.24-14.11.24	

Здобувач

_____ (підпис)

Дар'я БЛАГОДИР

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Тетяна ПИРОГ

_____ (ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification work is focused on studying the regulation of the biological activity of surfactants synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 in a liquid medium containing glycerol of varying quality, in the presence of the biological inducer *Enterobacter cloacae* C-8 in different physiological states.

It was established that, regardless of the cultivation method of *E. cloacae* C-8, the introduction of live cells of these bacteria into the *A. calcoaceticus* IMV B-7241 cultivation medium with glycerol of varying purity levels was accompanied by the synthesis of surfactants, with minimum inhibitory concentrations (MICs) against bacteria and yeasts being 1.5 to 28 times lower, adhesion of test cultures on abiotic materials treated with these surfactants being 1-42% lower, and biofilm degradation being 10-48% higher compared to surfactants produced in a medium without an inducer. A similar degree of biofilm destruction was observed with the use of the supernatant after inducer cultivation. The use of inactivated *E. cloacae* C-8 cells as an inducer proved to be less effective: the MICs of surfactants synthesized in their presence were 2.3 to 4.6 times lower, adhesion was 2-35% lower, and biofilm degradation was 4-25% higher compared to surfactants obtained in the medium without an inducer.

The potential synergy of tea tree essential oil with surfactants synthesized by *A. calcoaceticus* IMB B-7241 in a glycerol-based cultivation medium of varying purity, in the presence of the biological inducer *E. cloacae* C-8 in different physiological states, was established for the purpose of destroying dual-species biofilms. Specifically, the degree of destruction of dual-species bacterial biofilms when treated with a mixture of surfactants synthesized in a medium with glycerol of varying quality, combined with tea tree essential oil, was 2–21% higher compared to the use of these surfactants and essential oil separately. At the same time, the destruction of dual-species bacterial-yeast biofilms by a similar combination of antimicrobial agents was 16–32% higher compared to the levels achieved with single biocides.

The explanatory note consists of an introduction, 5 chapters, conclusions, a list of references containing 126 sources, and an appendix. The total volume of the work is 125 pages and includes 27 tables.

Key words: surfactants, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, inducer, physiological state of inducer, biological activity, essential oil.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота направлена на дослідження регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин (ПАР), синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення, за наявності біологічного індуктора *Enterobacter cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані.

Встановлено, що незалежно від способу вирощування *E. cloacae* С-8 внесення живих клітин цих бактерій у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з гліцерином різного ступеня очищення супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) яких щодо бактерій і дріжджів були у 1,5–28 разів нижчими, адгезія тест-культур на абіотичних матеріалах, оброблених такими ПАР, була на 1–42 % нижчою, а ступінь руйнування біоплівки на 10–48 % вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, одержаних у середовищі без індуктора. Аналогічний ступінь деструкції біоплівки був встановлений й за використання супернатанту після вирощування індуктора. Використання як індуктора інактивованих клітин *E. cloacae* С-8 виявилось менш ефективним: МІК ПАР, синтезованих за їх наявності, були нижчими у 2,3-4,6 разів, адгезія – на 2-35% нижчою, деструкція біоплівки – на 4-25 % вищою порівняно з ПАР, отриманими у середовищі без індуктора.

Встановлено можливість синергізму ефірної олії чайного дерева із ПАР, синтезованими *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі культивування із гліцерином різної якості за внесення біологічного індуктора *E. cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані, з метою руйнування двовидових біоплівок. Так, ступінь деструкції двовидових бактеріальних біоплівок за обробки сумішшю ПАР, синтезованих у середовищі з гліцерином різної якості за внесення клітин *E. cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані, з ефірною олією чайного дерева був вищим на 2-21 %, порівняно із використанням таких ПАР і ефірної олії окремо. У той же час деструкція двовидових бактеріально-дріжджових біоплівок за дії аналогічної комбінації антимікробних препаратів була на 16-32 % вищою порівняно з показниками, встановленими для монобіоцидів.

Пояснювальна записка включає вступ, 5 розділів, висновки та список використаної літератури із 126 найменувань та додаток. Загальний обсяг роботи – 125 сторінок та 27 таблиць.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, індуктор, фізіологічний стан індуктора, біологічна активність, ефірна олія.

ЗМІСТ

ABSTRACT.....	4
РЕФЕРАТ.....	5
ВСТУП.....	8
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	10
РОЗДІЛ 1. ШЛЯХИ ВИКОРИСТАННЯ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ	10
1.1 Обсяги виробництва відходів виробництва біодизелю у світі: тенденції зростання та прогнози розвитку.....	10
1.2 Галузі застосування відходів виробництва біодизелю.....	11
РОЗДІЛ 2. МІКРОБНІ ТЕХНОЛОГІЇ НА ОСНОВІ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ.....	17
2.1 Спирти та розчинники.....	17
2.2 Поліюли.....	21
2.3 Органічні кислоти.....	28
2.4 Вітаміни, попередники вітамінів та вітаміноподібні речовини.....	34
2.5 Ліпіди.....	36
2.6 Полімери.....	42
2.7 Поверхнево-активні речовини.....	45
2.8 Інші продукти мікробного синтезу.....	53
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	60
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	60
3.1. Об'єкти досліджень.....	60
3.2. Умови культивування <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB В-7241.....	60
3.3. Підготовка біологічного індуктора <i>Enterobacter cloacae</i> С-8.....	61
3.4. Виділення і визначення концентрації поверхнево-активних речовин.....	62
3.5. Дослідження антимікробної активності поверхнево-активних речовин.....	63
3.6. Визначення антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин.....	64
3.7. Дослідження ступеня руйнування одновидових біоплівки за дії поверхнево-активних речовин.....	65

3.8. Дослідження ступеня руйнування двовидових бактеріальних біоплівки під впливом суміші поверхнево-активних речовин з ефірною олією.....	65
3.9. Дослідження ступеня руйнування двовидових бактеріально-дріжджових біоплівки за дії суміші поверхнево-активних речовин з ефірною олією.....	66
3.10. Статистична обробка даних.....	67
РОЗДІЛ 4. БАКТЕРІЇ РОДУ <i>ENTEROBACTER</i> ЯК ФАКТОР РЕГУЛЯЦІЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> IMB B-7241.....	68
4.1. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності біологічних індукторів.....	68
4.2. Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин.....	76
4.3. Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на здатність поверхнево-активних речовин руйнувати біоплівки.....	84
РОЗДІЛ 5. СИНЕРГІЗМ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СУМІШІ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ ТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> IMB B-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ КОНКУРЕНТНИХ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>ENTEROBACTER</i>	94
5.1. Деструкція двовидових біоплівки за дії комплексу поверхнево-активних речовин з ефірною олією чайного дерева.....	94
ВИСНОВКИ.....	104
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	105
ДОДАТКИ.....	122

ВСТУП

В останні роки підвищилася потреба у переробці відходів від продуктів харчування, деревинної промисловості та сільського господарства. Наприклад, відходи виробництва біодизелю стають доволі масштабною проблемою через потребу в утилізації їх великих обсягів (Chmielarz, Blomqvist, Sampels, Sandgren, & Passoth, 2021). Найефективнішим способом утилізації таких відходів є їх використання як субстратів у біотехнологічних процесах для отримання практично цінних продуктів. Збільшення ефективності технологій мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) є одним із шляхів використання дешевих промислових відходів, зокрема відходів виробництва біодизелю, що дасть змогу суттєво знизити собівартість цільового продукту і підвищити ефективність біотехнологічного виробництва (Crosse, Brady, Zhou, & Rumbold, 2019).

Раніше було встановлено, що *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 синтезує комплекс поверхнево-активних речовин (ПАР) аміно- і гліколіпідів на широкому спектрі вуглецевих субстратів, у тому числі й на очищеному гліцерині та відходах виробництва біодизелю (Pirog, Lutsai, & Muchnyk, 2021). Разом з тим дослідження біологічної активності ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, показало, що такі поверхнево-активні речовини виявилися менш ефективними антимікробними агентами порівняно з утвореними на очищеному гліцерині (Pirog, Lutsay, Kliuchka, & Veregova, 2019).

У наукових літературних джерелах [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>] відмічається значна кількість публікацій з ключовими словами «co-cultivation» і «co-culture», де мова йде про культивування продуцентів антимікробних метаболітів з іншими мікроорганізмами, які в більшості роботах називаються конкурентними, або біологічними індукторами (Пирог, Іванов, & Ярова, 2021). Як результат такого «комбінованого» культивування є підвищення синтезу та/або активності антимікробних метаболітів, розширення спектру або навіть утворення

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Благодир Д. О.				Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						8	125
Керівник	Пирог Т. П.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.	Стабніков В. П.						
ВСТУП							

нових сполук, раніше не синтезовані монокультурою (Kumar, 2021). Так наприклад, культивування деяких новостворених асоціацій молочнокислих бактерій стимулювало вироблення ними бактеріоцинів із підвищеною антимікробною активністю (Matevosyan, Bazukya, & Trchounian, 2019).

Раніше (Пирог, Іванов, & Ярова, 2021) було встановлено позитивний вплив грампозитивних бактерій *Bacillus subtilis* БТ-2 на антимікробну активність поверхнево-активних речовин у *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на відходах виробництва біодизелю.

З літератури (Luti, 2018; Song, 2020) відомо, що біологічна активність вторинних метаболітів залежить від типу (грампозитивні чи грамнегативні бактерії, гриби, дріжджі) конкурентних мікроорганізмів, чи біологічних індукторів.

Крім того, зважаючи на те, що мікробні інфекції утворені біоплівками є широко дослідженою клінічною та харчовою проблемою, зокрема інфекції пов'язані з полімікробними біоплівками спричиняють значно вищі показники смертності порівняно з тими, які пов'язані з біоплівками одного виду, це вимагає розробки нових антибіоплівкових стратегій, оскільки мікробні клітини в біоплівці виявляють високу стійкість до антимікробних агентів, а полімікробні біоплівки здебільшого не піддаються руйнуванню за допомогою обробки монобіоцидами, і зазвичай вимагають комплексної дії біосумісних антимікробних сполук (Ceresa, 2021; Tan, 2020; Bai, 2022). До прикладу, використання ефірних олій, як природних вторинних антимікробних метаболітів широкого спектру дії, у поєднанні з антибіотиками можуть відновити чутливість мікробних інфекцій до них, при цьому зменшивши мінімальну інгібуючу концентрацію, розширивши спектр антимікробної дії та знизивши вартість такої обробки (Grădinaru, Trifan, Şpac, Brebu, Miron, & Aprotosoiaie, 2018).

У зв'язку з викладеним вище, **мета даної роботи** – дослідити біологічну активність, а також синергетичний ефект з ефірними оліями ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення, за наявності конкурентних грамнегативних бактерій *Enterobacter cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1

ШЛЯХИ ВИКОРИСТАННЯ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА

БІОДИЗЕЛЮ

Загалом виробництво біодизелю зростає в усьому світі, оскільки його отримують з відновлюваних біологічних джерел (тваринних жирів, рослинних олій або перероблених ресторанних відходів кулінарної олії та жиру тощо), і він є екологічно чистою альтернативою нафтовому дизельному паливу за рахунок нетоксичності та біорозкладним властивостям, що є головною причиною збільшення кількості відходів виробництва біодизелю на ринку (Liu, 2022; Kaur, 2020).

1.1. Обсяги виробництва відходів виробництва біодизелю у світі:

тенденції зростання та прогнози розвитку

Поточне дослідження ринку від Trusted Business Insights у 2021 році [<https://www.trustedbusinessinsights.com/details/glycerol-market-2020-and-forecast-2021-2027>] показує, що розмір світового ринку гліцерину становив 1,5 мільярда доларів США у 2020 році і, як очікується, зростатиме із сукупним річним темпом зростання (CAGR) 3,9% з 2021 по 2027 рік.

За цими даними стає зрозуміло, що відходи виробництва біодизелю мають глибокий вплив на майбутній розвиток біодизельної промисловості, оскільки на кожні 10 кг виробленого біодизелю під час реакції переетерифікації генерується приблизно 1 кг побічного продукту. Деякі статистичні дані демонструють, що щорічно утворюється значна кількість залишків гліцеринової фази (не менше 200-300 тонн, до сотень тисяч тонн на рік), в залежності від галузі виробництва біодизелю кожної країни (Mitrea, Trif, & Cătoi, 2017). Відповідно до останнього звіту Організації економічного співробітництва та розвитку (ОЕСР), світове виробництво біодизелю становило близько 0,7 мільйонів тонн у 2022 році,

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 1. Шляхи використання відходів виробництва біодизелю</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Благодир Д. О.</i>						10	125
<i>Консульт.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т. П.</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В. П.</i>							

а світовий ринок біодизелю, як очікується, досягне 49 882 мільйонів літрів у 2030 році, [<https://www.apk-inform.com/uk/exclusive/topic/1528162>] що припускає, що буде вироблено близько 4 мільярдів галонів відходів виробництва, надлишок яких, як побічного продукту при виробництві біодизелю, вплине на ринок рафінованого гліцерину.

1.2. Галузі застосування відходів виробництва біодизелю

Зважаючи на значний потік відходів виробництва біодизелю, як основного побічного продукту низької вартості, це створює загрозу як для навколишнього середовища, так і для економіки. Отже, існує потреба в розробці економічно привабливих та стійких процесів із залученням відходів виробництва біодизелю. Відходи виробництва біодизелю отримують у чотирьох різних галузях промисловості, наприклад, з миловарної промисловості, промисловості жирних кислот, біодизеля та промисловості жирних ефірів, також його можна отримати з пропіленоксиду (Kumar, Yellapu, Tyagi, & Zhang, 2019).

Основне споживання відходів виробництва біодизелю в 2020 році було відзначене у таких галузях: полімерна промисловість (12%), косметична промисловість (13%), особиста гігієна (15%), харчова промисловість (23%), фармацевтична промисловість (11%), промисловість вибухових матеріалів (2%), тютюнове виробництво (4%), алкідні смоли (8%), інші сфери (10-12%). Найвища категорія використання побічного продукту включає його застосування у фармацевтиці, засобах особистої гігієни для догляду за порожниною рота та у косметичній промисловості, оскільки він є чудовим інгредієнтом для збереження вологості [<https://www.trustedbusinessinsights.com/details/glycerol-market-2020-and-forecast-2021-2027>]. За останні роки, з великою кількістю відходів виробництва біодизелю, що утворюються, з'явилися нові можливості перетворення його у хімічні речовини з даною вартістю. Було вивчено багато підходів до використання даних відходів, таких як використання його у кормах для тварин та як джерело енергії при спалюванні (Kaur, Sarma, Jha, & Gera, 2020).

Окрім цього, у літературі відзначали застосування відходів виробництва біодизелю у галузі товарної хімії, як природні органічні будівельні блоки для різноманітних органічних хімікатів і кислот); у харчовій промисловості, як підсолоджувач, консервант та загущувач; у енергетиці, як заміна викопного талива та біогазу; у хімічній промисловості, як хімічно стійкі речовини для проклейки та пом'якшення пряжі й тканин, як антифризні та термохімічні продукти; а також у фармацевтиці як добавки до ліків, дерматологічних засобів та засобів по догляду за ротовою порожниною тощо (Kumar, Yellapu, Tyagi, & Zhang, 2019).

Широкий спектр галузей промисловості, зазначених попередньо, можуть використовувати відходи виробництва біодизелю в складі їх технологій або продукції, однак дані відходи за рахунок високого вмісту домішок (метанол, хлориди натрію або калію, етанол, золу, смоли, нелеткі органічні речовини, важкі метали, сірчанокислі сполуки (Kumar, Yellapu, Tyagi, & Zhang, 2019) не мають достатньо високого класу чистоти для застосування у цих сферах. Зважаючи на високий рівень забруднення відходів виробництва біодизелю та великі обсяги їх утворення, вартість даної сировини була значно здешевлена. Ціна відходів виробництва біодизелю (з чистотою 80%) знизилася з 0,25/фунт доларів США до 0,05/фунт доларів США (Vivek та ін., 2017), тоді як очищений гліцерин (>99% чистоти) коштує близько 0,70–1,96/фунт доларів США за кілограм (Yuliana, Trisna, Sari, & Lunardi, 2021).

Для очищення відходів виробництва біодизелю доступні різноманітні практичні техніки та методи, такі як центрифугування, відбілювання та хімічна обробка. У хімічній обробці реакція нейтралізації з використанням сильної кислоти для видалення каталізатора та мила є найпоширенішим методом, який використовується в процесі попередньої обробки відходів. Солі, що утворюються в результаті нейтралізації, можна видалити шляхом декантації та фільтрації. Процедура відбілювання ефективно зменшує велику кількість вільних жирних кислот (ВЖК), запах і пігментовані сполуки (каротиноїди та хлорофіл), що містяться у відходах біодизельної промисловості (Liu, Zhong, & Lawal, 2022).

Воду та метанол у фазі гліцерину можна розділити дистиляцією за допомогою простого процесу дистиляції, а шар гліцерину можна нейтралізувати каустичною содою. Після відновлення продукту здійснюється процес очищення гліцерину до рівня чистоти, необхідного для харчового або фармацевтичного класу, які є дуже дорогими. У той час як неочищені відходи біодизельної промисловості можуть бути використані як підсилювач продуктивності осаду стічних вод, гліцерин високої чистоти знайшов широке застосування в різних галузях промисловості, починаючи від полімерної, фармацевтичної, косметичної та закінчуючи харчовою продукцією (Yuliana, Trisna, Sari, & Lunardi, 2021).

Одним із найпростіших способів утилізації відходів виробництва біодизелю є його спалювання як палива, до того ж без жодних дорого вартісних методів очищення. Проте даний спосіб ще не був введений у дію, оскільки має власні технологічні обмеження при його спалюванні, а саме: проміжна теплоутворювана здатність, підвищена в'язкість, є антипіреном, містить солі та воду, які ускладнюють горіння (Muelas, 2020; Liu, 2022).

Setyawan зі співавт. (Setyawan, Zhu, Zhang, & Zhang, 2016) порівнювали відходи виробництва біодизелю з чистим гліцерином, нафтовим дизелем та етанолом для дослідження характеристики займання та горіння однієї краплі відходів виробництва біодизелю. За однакової температури загальний час згорання та час затримки займання відходів виробництва біодизелю посідали друге місце після чистого гліцерину, тоді як швидкість згорання була найбільшою. Результати показують, що домішки, головним чином вода та метанол, сильно впливають на ефективність згорання відходів виробництва біодизелю.

Спільне спалювання відходів виробництва біодизелю з іншими відновлюваними рідинами також є життєздатним варіантом, оскільки воно не сприяє викидам CO_2 і не збільшує концентрацію шкідливих продуктів (SO_2 , NO_x і CO) згорання. Makarevičienė зі співавт. (Makarevičienė, Kazancev, Sendžikienė, & Gumbytė, 2023) спалювали суміш відходів виробництва біодизелю з етанолом у поршневому двигуні з іскровим запалюванням для аналізу токсичного вмісту, термодинаміки згорання та продуктивності двигуна у вихлопних газах, що виділяються під час згорання.

Відходи виробництва біодизелю можуть використовуватися в рідинах для підвищення вилучення нафти (Mota, Peres Pinto, & de Lima, 2017). Тим не менш, це використання обмежується логістикою, оскільки нафтові родовища мають бути в безпосередній близькості від заводів з виробництва біодизелю, щоб уникнути надмірних витрат на транспортування.

Як відомо гліцерин почали використовувати для годування тварин ще з 1970-х років, проте складність відзначалася у його постачанні. Підвищення цін на зернові культури та, відповідно до вищезазначених даних, надлишок відходів виробництва біодизелю сприяли зростання інтересу щодо його застосування у кормах для тварин. Тим не менш, варто зауважити, що перш ніж ввести його використання у корма, вони потребують попереднього очищення, яке є доволі дорого вартісним процесом для досягнення відповідного рівня чистоти (Yuliana, 2021; Liu, 2022). Підвищення чистоти гліцерину вимагає кількох етапів обробки, включаючи нейтралізацію, осадження, дистиляцію та відбілювання/очищення за допомогою активованого вугілля, тому спостерігається ринкова ціна очищеного гліцерину в 14-40 разів вища, ніж ціна відходів виробництва біодизелю.

Так, Louvado зі співавт. (Louvado, Coelho, & Palma, 2020) провели експерименти щодо вивчення впливу додавання очищених відходів виробництва біодизелю як добавки під час годування *Dicentrachus labrax*. Результати показали, що додавання цієї добавки не вплинуло на склад кишкової мікрофлори даного виду риб, але при цьому зменшило катаболізм амінокислот.

Також El-Hawarry зі співавт. (El-Hawarry, Shourbela, Haraz, Khatab, & Dawood, 2021) у своїх дослідженнях з нільськими тілапіями використовували для їх вирощування очищені відходи виробництва біодизелю, патоку та крохмаль як джерела вуглецю для формування різних біофлоків. Встановлено, що при низькій щільності посадки вміст білка та ліпідів у всьому тілі у біофлоках демонструє найвищу цінність за додавання очищених відходів.

Для зменшення кишкових викидів метану великою рогатою худобою Karlsson зі співавт. (Karlsson, Ramin, Kass, Lindberg, & Holtenius, 2019) замінили пшеничний

крохмаль на очищені відходи виробництва біодизелю у трав'яному силосі та загальних змішаних раціонах на основі ячменю, оскільки відходи виробництва біодизелю можуть забезпечити енергією, необхідною для виробництва молока без збільшення вироблення метану в кишківнику худоби. Проте результати науковців показали, що дана заміна збільшила викиди метану без впливу на врожайність.

Гігроскопічні властивості гліцерину зробили його незамінним компонентом у косметичній промисловості, особливо в продуктах по догляду за шкірою та дерматологічних препаратах, які ефективно діють проти старіння та різних дерматологічних розладів, що супроводжуються сухістю шкіри (Basal, Issa, Mohammed, & Mazen, 2020). За результатами досліджень (Yousef, Alhajj, & Sharma, 2023) впливу різного ступеня очищення відходів виробництва біодизелю було зафіксовано значні ураження епідермісу неочищеними відходами виробництва біодизелю. Вплив концентрованого гідроксиду калію та метилового спирту, присутніх як домішки у відходах, можуть бути основною причиною появи виразок і деяких ерозійних плям. Тому для знешкодження цих токсичних сполук було використано метод очищення відходів за допомогою цеоліту, які реагують з фосфорною кислотою для перетворення алкоксидних солей і жирних кислот у відповідні спиртові та карбоксилатні солі. Отриману вільну жирну кислоту видаляють шляхом адсорбції за допомогою цеоліту або відбілюючої глини, що забезпечує низькі експлуатаційні витрати та високу ефективність. Після отримання частково очищених відходів виробництва біодизелю за використання активованого цеоліту відзначалися незначні втрати епідермісу в одних плямах і нормальний вигляд в інших на додаток до неушкодженого шару шкіри, що можна пояснити частково підвищеною чистотою напівочищених відходів. Поліпшення зовнішнього вигляду шарів шкіри також можна пояснити початком підтягування води з глибоких шарів шкіри до епідермального шару, що призводить до зволоження.

Таким чином, з вище описаної інформації стає зрозуміло, що досліджень із використання відходів виробництва біодизелю наведено недостатньо, оскільки саме очищений гліцерин набуває більш ширшого застосування, хоча методи для його очищення несуть додаткові витрати. З цієї точки зору все ще є можливості для підвищення придатності відходів виробництва біодизелю для подальшого застосування,

так як різні модельні сполуки цих відходів слід вивчати як сировину, при цьому зменшуючи витрати на очищення та розширюючи їх застосування. Наприклад, у сфері анаеробного культивування можна провести дослідження, щоб знайти мікроорганізми, здатні переносити домішки в сирому гліцерині з хорошими результатами культивування. Через складний склад відходів виробництва біодизелю їх термічне перетворення в H_2 або синтетичний газ вимагає розробки відповідного реактора з активним і стійким до механізму реакції каталізатором (Liu, Zhong, & Lawal, 2022).

РОЗДІЛ 2

МІКРОБНІ ТЕХНОЛОГІЇ НА ОСНОВІ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ

Відходи виробництва біодизелю стали дуже конкурентоспроможними порівняно з дорогими цукрами завдяки нижчій ціні, відповідно до чого вони представляють себе як привабливе джерело вуглецю для промислового виробництва біомаси та мікробних продуктів з доданою вартістю (Crosse, Brady, & Zhou, 2020).

У наукових джерелах, де відходи виробництва біодизелю використовують як джерело вуглецю для мікробного культивування, налічуються чисельні праці щодо синтезу спиртів, а в особливості 1,3-пропандіолу, який застосовується як розчинник у косметичній промисловості (Mohd Zain, Paramasivam, Tan, Lim, & Lee, 2020). Крім того, відходи виробництва біодизелю можуть використовуватися як єдиний субстрат для виробництва органічних кислот, поліолів, ліпідів, вітамінів та поверхнево-активних речовин також поширені в літературі (табл. 2.1-2.8). У той час як відомостей про утворення кетоз, ферментів, фітогормонів, біоводню та інших продуктів мікробного синтезу на основі відходів виробництва біодизелю налічується менше. При цьому інформації щодо виробництва біополімерів по типу полігідроксиалканоатів (Mohd Zain, Paramasivam, Tan, Lim, & Lee, 2020) з високою здатністю до біологічного розкладання, полісахаридів тощо також представлено у чималій кількості.

2.1. Спирти та розчинники

З доступних у науковій літературі досліджень щодо отримання спиртів та розчинників більша частина присвячена саме отриманню 1,3-пропандіолу (Tan, 2018; Jiang, 2021; Wang, 2022; Ju, 2021; Zhang, 2022; Wang, 2020) у той же час праці щодо синтезу ізопропанолу (Shi, Park, & Kim, 2022) та бутанолу (Zhang, Sharma, Ma, & Zeng, 2022) зустрічаються поодинокі. До того ж бактерії роду

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>	<i>Благодир Д. О.</i>				<i>Розділ 2. Мікробні технології на основі відходів виробництва біодизелю</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							17	125
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т. П.</i>					Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В. П.</i>							

Clostridium є найчастіше застосованими продуцентами із найвищими показниками синтезу даного класу сполук, проте молочнокислі бактерії роду *Lactobacillus* теж не відстають у кінцевих титрах культивування. Зазначимо, що найвищі концентрації спиртів та розчинників були відмічені у разі повторюваного періодичного культивування продуцентів з підживленням, порівняно із класичним культивуванням.

Оскільки висока вартість виробництва 1,3-пропандіолу є одним із факторів, що перешкоджають освоєнню даного процесу у промисловому масштабі, тому щоб знизити витрати, відходи виробництва біодизелю можна використати на заміну очищеному гліцерину. Так зважаючи на домішки, що містяться у відходах виробництва біодизелю, у дослідженні (Tan та ін., 2018) було запропоновано прямий та ефективний процес попередньої обробки відходів шляхом мікрофільтрації для видалення вільних жирних кислот (ВЖК), які можуть пригнічувати культивування. Такий підхід значно знижує витрати на попередню очистку відходів у порівнянні з іншими методами: підкислення, екстракція розчинником, електродіаліз, адсорбція активованим вугіллям та іонообмінні смоли. За результатами культивування *Clostridium butyricum* JKT37 була зафіксована висока продуктивність 1,3-пропандіолу (10,6 г/л), яка була досягнута за додавання 20,8 г/л очищених відходів виробництва біодизелю, що на 62,4% вище, порівняно із використанням відходів без попередньої очистки, що доводить вагомий вплив домішок на культивування.

Проте все ж використання попередньої очистки відходів виробництва біодизелю є доволі затратним процесом як в часовому, так і грошовому еквіваленті, що у свою чергу, спонукає науковців досліджувати інші технології, які б виключали даний етап, і, в особливості, давали можливість використання відходів у нестерильному вигляді. Так Jiang зі співавт. (Jiang та ін., 2021) розглянули перспективу використання мікробного консорціуму CJD-S, який складається з 85,99% видів бактерій *Enterobacteriaceae* та 13,75% *Enterococcaceae*, для синтезу 1,3-пропандіолу на відходах виробництва біодизелю. Відповідно до чого концентрація 1,3-пропандіолу, отримана у нестерильному поживному середовищі з неочищеними відходами виробництва біодизелю при періодичному культивуванні (40 г/л) та культивуванню з піджив-

ленням (20 г/л) у нестерильних умовах становила 41,47 г/л, що демонструє нам високий вихід продукту з доданою вартістю при спрощеному процесі культивування та знижених виробничих витратах.

У іншій роботі (Wang та ін., 2020) дослідники припустили, послідовне періодичне культивування з підживленням може забезпечити напівбезперервне виробництво 1,3-пропандіолу з вищою продуктивністю, ніж повторне періодичне культивування з підживленням, що у висновку значною мірою сприятиме промислому виробництву 1,3-пропандіолу штамом *C. butyricum* DL07. Так, за початкової концентрації відходів виробництва біодизелю 40 г/л та контролю концентрації залишкових відходів на рівні близько 20 г/л, спостерігали високий рівень синтезу 1,3-пропандіолу – 94,2 г/л. Цей процес дозволяє уникнути культивування посівного матеріалу та вирішує потенційну проблему скорочення часу циклу, спричинену низькою якістю посівного матеріалу при повторюваному періодичному культивуванню з підживленням.

Wang зі співавт. (Wang, Zhou, & Liu, 2022) також намагалися оптимізувати умови культивування *C. butyricum* DL07 для отримання 1,3-пропандіолу шляхом стратегії безперервної подачі відходів виробництва біодизелю з підживлення (початкова концентрація становила 40 г/л, залишкова – 20 г/л). Відповідно до чого кінцева концентрація 1,3-пропандіолу, зафіксована за таких умов, становила 88,6 г/л.

Відомо, що молочнокислі бактерії є «загально визнаними безпечними штамми» (GRAS) та мають перевагу у тому, що виробляють 1,3-пропандіол природним шляхом навіть у мікроанаеробних умовах, проте індустріалізації даного процесу перешкоджає підвищення концентрації синтезованих ними органічних кислот, які пригнічують їх ріст, а також отримання бажаних метаболітів. Для вирішення даної проблеми у дослідженні (Ju та ін., 2021) була зроблена спроба отримання молочнокислих бактерій з підвищеною резистентністю до органічних кислот шляхом мутагенезу електронно-променевого опромінення з метою покращення їх культуральних характеристик на відходах виробництва біодизелю. Так, завдяки підвищенню стійкості до органічних кислот штаму *Lactobacillus reuteri* JH83 при періодичному культивуванні з підживленням на відходах виробництва біодизелю, була зафіксована найвища концентрація 1,3-пропандіолу – 93 г/л, порівняно зі штамом дикого типу (85,2 г/л).

Цікавий метод використано у роботі (Zhang, Sharma, Ma, & Zeng, 2022) для підвищення здатності *C. pasteurianum* C8 до утилізації відходів виробництва біодизелю з метою отримання 1,3-пропандіолу та бутанолу, а саме нова автоматична система ALE, розроблена для тривалої адаптації штаму до даних відходів. Використовуючи моніторинг росту клітин у реальному часі та точний контроль достатньо низької біомаси, дозволило отримати максимальний синтез 1,3-пропандіолу та бутанолу (81,21 г/л та 2,47 г/л відповідно) штамом C8 на поживному середовищі із 120 г/л відходів виробництва біодизелю при задовільній швидкості росту. Таким чином цей інтегрований підхід забезпечує промислово привабливий шлях для одночасного виробництва двох привабливих продуктів із відходів виробництва біодизелю, що значно покращує економічність процесу та екологію.

Іншим важливим метаболітом, який широко використовується як біопаливо та дезінфікуючий засіб, є ізопропанол. Так у дослідженні (Shi, Park, & Kim, 2022) Shi зі співавт. оптимізували поживне середовище для культивування *Yarrowia lipolytica* YLnphT7IPA шляхом додавання 70 г/л відходів виробництва біодизелю, що призвело до 4,47-кратного збільшення виробництва ізопропанолу, забезпечуючи при цьому більш дешевий та екологічний спосіб виробництва. Порівняння використання очищеного гліцерину та відходів виробництва біодизелю як джерела вуглецю для культивування *Y. lipolytica* YLnphT7IPA вказує, що максимальне виробництво ізопропанолу є майже ідентичне: 1,94 г/л та 1,60 г/л відповідно.

Отже, розглядаючи різноманітні продуценти у широкому діапазоні доволі високих концентрацій відходів виробництва біодизелю (20,8-120 г/л) було зафіксовано відповідно високі концентрації 1,3-пропандіолу (10,6-94,2 г/л) та менш значні бутанолу (2,47 г/л) та ізопропанолу (1,60 г/л). Варто зазначити, що у роботах (Jiang, 2021; Wang, 2022; Ju, 2021; Wang, 2020), де автори застосовували культивування з підживленням спостерігали найвищі концентрації синтезу 1,3-пропандіолу: 41,47-94,2 г/л, хоча відповідно до результатів праці (Zhang, Sharma, Ma, & Zeng, 2022) за максимальної концентрації субстрату (120 г/л) без додаткового підживлення показники синтезу 1,3-пропандіолу були теж на рівні – 81,21 г/л.

Узагальнені дані щодо спиртів та розчинників, синтезованих на відходах виробництва біодизелю розміщені у таблиці 2.1.

2.2. Поліоли

Окрім спиртів та розчинників, нам також вдалось знайти інформацію щодо ефективного синтезу поліолів у середовищі з відходами виробництва біодизелю. Більшість із останніх досліджень зосереджені на отриманні таких поліолів як еритритол (Rzechonek, 2018; Yang, 2022; Jagtap, 2021) та манітол (Rzechonek, 2018; Giacomobono, 2022; Jagtap, 2021), у меншості спостерігаються роботи щодо синтезу ксиліту (Prabhu, Thomas, & Ledesma-Amaro, 2020) та арабітолу (Jagtap, Bedekar, & Singh, 2021), до того ж переважна кількість штамів здатна виробляти одразу комплекс поліолів. Варто зазначити, що у всій опрацьованій літературі для синтезу поліолів була надана перевага виду *Yarrowia lipolytica*, штами якого проявляли різну біосинтетичну здатність залежно від концентрації відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі.

Jagtap зі співавт. (Jagtap, Bedekar, & Singh, 2021) піддали відходи виробництва біодизелю переетерифікації, центрифугуванню та відновленню для очищення від супутніх домішок з подальшою можливістю синтезу комплексу цукрових спиртів, а саме: еритритолу, манітолу і арабітолу. Так за результатами досліджень було виявлено, що *Y. lipolytica* PO1f продукує еритритол, манітол і арабітол під час росту на середовищі з 100 г/л очищеними відходами виробництва біодизелю, у кількостях $16,7 \pm 1,5$ г/л; $9,9 \pm 0,1$ г/л; $5,0 \pm 0,1$ г/л відповідно, при чому утилізація відходів була збільшена в 2,5 рази.

Спирти та розчинники як практично важливі метаболіти, отримані на відходах виробництва біодизелю

№	Назва метаболіту	Продуцент	Концентрація продукту	Концентрація відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі	Попередня очистка відходів виробництва біодизелю	Спосіб очистки відходів виробництва біодизелю	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,3-пропандіол	<i>Clostridium butyricum</i> JKT37	10,6 г/л	20,8 г/л	+	Нагрівання (для видалення метанолу). Мікрофільтрація (для очищення від вільних жирних кислот).	Тан та ін, 2018
		Мікробний консорціум <i>CJD-S</i> (85,99% <i>Enterobacteriaceae</i> та 13,75% <i>Enterococcaceae</i>)	41,47 г/л	40 г/л (20 г/л гліцерину підтримували шляхом його додавання під час культивування)	-	-	Jiang та ін., 2021
		<i>Clostridium butyricum</i> DL07	88,6 г/л	40 г/л (20 г/л гліцерину підтримували шляхом його додавання під час культивування)	-	-	Wang, Zhou, & Liu, 2022
		<i>Lactobacillus reuteri</i> JH83	93 г/л	25 г/л (Підживлюваний розчин складався з 450 г глюкози та 562,5 г неочищеного гліцерину в 1 л дистильованої води)	-	-	Ju та ін., 2021
		<i>Clostridium pasteurianum</i> C8	81,21 г/л	120 г/л	-	-	Zhang, Sharma, Ma, & Zeng, 2022

Закінчення табл. 2.1

1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,3-пропандіол	<i>Clostridium butyricum</i> DL07	94,2 г/л	Початковий вміст 40 г/л, далі підтримувався на рівні 20 г/л.	-	-	Wang та ін., 2020
2	Ізопропанол	<i>Yarrowia lipolytica</i> YLnphT7IPA	1,60 г/л	70 г/л	-	-	Shi, Park, & Kim, 2022
3	Бутанол	<i>Clostridium pasteurianum</i> C8	2,47 г/л	120 г/л	-	-	Zhang, Sharma, Ma, & Zeng, 2022

У іншій роботі (Rzechonek, Dobrowolski, Rymowicz, & Mirończuk, 2018) науковці провели експеримент з іншим штамом *Y. lipolytica* A101 за умов культивування на відходах виробництва біодизелю без попереднього очищення в асептичних умовах. Даний штам досяг аналогічних показників синтезу еритритолу ($16,1 \pm 0,7$ г/л) та манітолу ($10,3 \pm 0,3$ г/л) під час росту на середовищі з 100 г/л неочищеними відходами виробництва біодизелю, що дозволяє знизити витрати на етапи їх очистки в рази, порівняно з результатами праці (Jagtap, Bedekar, & Singh, 2021).

Для покращення синтезу еритритолу було використано низку раціональних метаболічних підходів у нещодавно опублікованій роботі (Yang та ін., 2022). Так мутантний штам *Y. lipolytica* Y-11, отриманий шляхом тандемної гіперекспресії *GUT1*, *GUT2*, *TKL1* та *TAL1*, демонструє нам толерантність до високих концентрацій відходів виробництва біодизелю (250 г/л) та найвищий вихід еритритолу (150 г/л), коли-небудь зареєстрований у *Y. lipolytica*. Відходи виробництва біодизелю, як джерело вуглецю, може ефективно обмежувати синтез побічних продуктів, одночасно посилюючи вироблення еритритолу, порівняно з глюкозою, що свідчить про значний потенціал синтезу продуктів з доданою вартістю *Y. lipolytica* з відходів, при цьому ефективно їх утилізуючи.

У опрацьованій літературі чимало дослідників застосовують математичне моделювання за допомогою методології Response Surface Methodology (RSM) з метою попередньої теоретичної оцінки комбінованого впливу тестованих параметрів для отримання подальшого успішного результату на практиці. Так у роботі (Giacomobono, Albergo, Valerio, Caporusso, & De Bari, 2022) з метою повної утилізації відходів виробництва біодизелю *Y. lipolytica* DSM 8218 та максимального виходу манітолу науковці змоделювали власне дослідження за допомогою методології RSM, яка пов'язує співвідношення C/N маси та концентрацію відходів виробництва біодизелю. У результаті чого за оптимальних умов (дріжджовий екстракт, C/N 141, відходи виробництва біодизелю 33 г/л) конверсійний вихід манітолу становив 2 г/л, який є максимальним відповідно з повним вичерпанням субстрату відходів, проте необхідні подальші дослідження, щоб оцінити, чи є його виробництво вигідним або конкурентоспроможним.

Prabhu зі співавт. (Prabhu, Thomas, & Ledesma-Amaro, 2020) також намагалися застосувати один з математичних підходів з метою оптимізації середовища для синтезу ксиліту, а саме: двоетапну середню оптимізацію з використанням центрального композитного дизайну та штучної нейронної мережі в поєднанні з генетичним алгоритмом. Цей метод дозволив накопичити 50,5 г/л ксиліту, використовуючи штамом *Y. lipolytica* Po1t ко-субстрат відходи виробництва біодизелю (20 г/л)/ксилоза (55 г/л), порівняно з результатами синтезу ксиліту (53,2 г/л), де відходи були замінені на очищений гліцерин. Таким чином, використання відходів виробництва біодизелю та ксилози як дешевих субстратів біосинтезу становлять економічно ефективну систему біотехнологічного процесу на заміну очищеному гліцерину.

Отже, інформації щодо синтезу поліолів (еритритолу, манітолу, ксиліту, арабітолу) різними штамми *Y. lipolytica* наведено чимало, концентрації відходів виробництва біодизелю (20-250 г/л) були на порядок вищими, порівняно з вищеописаними відомостями щодо синтезу спиртів і розчинників, при цьому концентрації поліолів варіювалися, наприклад, у роботі (Yang та ін., 2022) наведено, що за наявності 250 г/л відходів виробництва біодизелю концентрація еритритолу становила 150 г/л і була вищою, порівняно з показниками, наведеними у статті (Rzechonek, Dobrowolski, Rymowicz, & Mirończuk, 2018) – $16,7 \pm 1,5$ г/л за наявності 100 г/л субстрату.

Узагальнені дані щодо поліолів, синтезованих на відходах виробництва біодизелю розміщені у таблиці 2.2.

Відходи виробництва біодизелю як перспективний субстрат для отримання поліолів

№	Назва метаболіту	Продуцент	Концентрація продукту	Концентрація відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі	Попередня очистка відходів виробництва біодизелю	Спосіб очистки відходів виробництва біодизелю	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Еритритол	<i>Yarrowia lipolytica</i> A101	16,1 ± 0,7 г/л	100 г/л	-	-	Rzechonek, Dobrowolski, Rymowicz, & Mirończuk, 2018
		<i>Yarrowia lipolytica</i> Y-11	150 г/л	250 г/л	-	-	Yang та ін., 2022
		<i>Yarrowia lipolytica</i> PO1f	16,7 ± 1,5 г/л	100 г/л	+	Переетерифікація, центрифугування, відновлення (для очищення від домішок, які містяться у відходах для отримання фракції гліцерину).	Jagtap, Bedekar, & Singh, 2021
2	Манітол	<i>Yarrowia lipolytica</i> A101	10,3 ± 0,3 г/л	100 г/л	-	-	Rzechonek, Dobrowolski, Rymowicz, & Mirończuk, 2018
		<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 8218	2 г/л	33 г/л	-	-	Giacomobono, Albergo, Valerio, Caporusso, & De Bari, 2022

Закінчення табл. 2.2

1	2	3	4	5	6	7	8
2	Манітол	<i>Yarrowia lipolytica</i> PO1f	9,9 ± 0,1 г/л	100 г/л	+	Переестерифікація, центрифугування, відновлення (для очищення від домішок, які містяться у відходах для отримання фракції гліцерину).	Jagtap, Bedekar, & Singh, 2021
3	Ксиліт	<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1t	50,5 г/л	20 г/л (Додаткове джерело вуглецю: ксилроза – 55 г/л)	-	-	Prabhu, Thomas, & Ledesma-Amaro, 2020
4	Арабітол	<i>Yarrowia lipolytica</i> PO1f	5,0 ± 0,1 г/л	100 г/л	+	Переестерифікація, центрифугування, відновлення (для очищення від домішок, які містяться у відходах для отримання фракції гліцерину).	Jagtap, Bedekar, & Singh, 2021

2.3. Органічні кислоти

Широкий спектр органічних кислот можна отримати при культивуванні різних мікроорганізмів, а в особливості грибів виду *Aspergillus niger* та дріжджів *Yarrowia lipolytica*, на відходах виробництва біодизелю. Так найбільше праць опубліковано саме щодо отримання яблучної (Iyyappan, 2018; Zambanini, 2016; Iyyappan, 2019; Iyyappan, 2020) та лимонної кислот (Rzechonek, 2018; Albergo, 2022; Książek, 2023), тоді як поодинокі можна розглянути дослідження щодо синтезу молочної кислоти (Jiang та ін., 2021), D-лактату (Wang, Liao, & Chiang, 2019) та бурштинової кислоти (Podleśny та ін., 2019). Варто зауважити, що для підсилення практичного виходу органічних кислот у більшості робіт науковці проводили культивування з підживленням, а також впроваджували додавання ко-субстратів.

Окрім 1,3-пропандіолу, Jiang зі співавт. (Jiang та ін., 2021) також розглянули варіант використання мікробного консорціуму CJD-S (85,99% видів бактерій *Enterobacteriaceae* та 13,75% *Enterococcaceae*) для синтезу молочної кислоти на відходах виробництва біодизелю. Так концентрація молочної кислоти, отриманої у нестерильному поживному середовищі з неочищеними відходами виробництва біодизелю при періодичній культивуванні (40 г/л) та культивуванні з підживленням (20 г/л) становили 45,86 г/л, що характеризується доволі високим виходом продукту з даною вартістю за економічно вигідних умов.

У ще одній статті (Rzechonek, Dobrowolski, Rymowicz, & Mirończuk, 2018), де штам *Y. lipolytica* A101 також культивували на відходах виробництва біодизелю без попереднього очищення в асептичних умовах завдяки рН 3,0, яке запобігало бактеріальному забрудненню, показники синтезу суміші лимонної та ізолимонної кислот становили $14,2 \pm 1,1$ г/л під час росту на середовищі з 100 г/л неочищеними відходами виробництва біодизелю.

У роботі (Giacomobono, Albergo, Valerio, Caporusso, & De Bari, 2022) для максимізації виходу лимонної кислоти при культивуванні *Y. lipolytica* DSM 8218 на відходах виробництва біодизелю дослідники скористалися методом попередньої теоретичної оцінки впливу тестованих параметрів (RSM), де оптимальними умовами є вне-

сення дріжджового екстракту, співвідношення C/N 141 та концентрації відходів виробництва біодизелю 33 г/л. Так конверсійний вихід лимонної кислоти становив 10 г/л, який є найбільш можливим відповідно з повним вичерпанням субстрату, і відповідає 35% максимальної теоретичної врожайності.

Książek зі співавт. (Książek, Janczar-Smuga, Pietkiewicz, & Walaszczyk, 2023) також намагалися оптимізувати склад поживного середовища для біосинтезу лимонної кислоти на відходах виробництва біодизелю за допомогою відповідного математичного методу. Так відходи виробництва біодизелю та аміачної селітри були визначені як головні змінні, які мали значний вплив на кінцеву концентрацію лимонної кислоти штамом *Aspergillus niger* PD-66, відповідно до чого найвище корисне значення, а саме максимальний синтез лимонної кислоти *A. niger* PD-66 (69,7 г/л) було отримано за таких оптимальних умов: відходи виробництва біодизелю – 114,14 г/л та аміачна селітра – 2,85 г/л.

Для культивування штаму *Escherichia coli* EcoB-170, адаптованого до високих концентрацій відходів виробництва біодизелю, з метою отримання ще одного важливого метаболіту d-лактату Wang зі співавт. (Wang, Liao, & Chiang, 2019) запропонували спрощену технологію дводозового культивування *E. coli* без контролю розчиненого кисню. Так початкова концентрація відходів складала 30 г/л, а після повного вичерпання субстрату (протягом 9 годин) у поживне середовище було додано ще 90 г/л відходів виробництва біодизелю, і після 35 год культивування практичний вихід d-лактату становив 115 г/л, що вище порівняно з умовою регуляції розчиненого кисню (105 г/л), яка є доволі складною та енерговичерпною у контролі.

У дослідницькій роботі (Podleśny та ін., 2019) авторами представлено інтенсифікацію продукції іншої органічної кислоти, а саме бурштинової кислоти за допомогою нового ізоляту *Enterobacter* sp. LU1, використовуючи ко-субстрат відходи виробництва біодизелю/сироватковий пермеат (60 г/л/60 г/л) у мікроанаеробних умовах, що привело до синтезу бурштинової кислоти у кількості 69 г/л після 144-ї години. Результати, представлені у даній роботі, є перспективними для майбутньої реалізації нової стратегії культивування бурштинової кислоти з високим виходом у промислову практику, залучаючи дешеву сировину.

Окрім описаних вже вище органічних кислот, виробництво комерційно цінної яблучної кислоти екологічним шляхом біосинтезу носить привабливий характер. Так відповідно до дослідження (Іууарпан та ін., 2018) було проведено генетичні модифікації *A. niger* МТСС 281 для поліпшення його культивування на попередньо очищених переетерифікацією відходах виробництва біодизелю у концентрації 60 г/л з додатковими джерелами вуглецю (сорбітол – 10 г/л, K_2CO_3 – 5 г/л) з метою синтезу $62,54 \pm 0,75$ г/л яблучної кислоти, що у 1,72 рази вище ніж за використання очищеного гліцерину.

Проте відповідно до наступних напрацювань, Іууарпан зі співавт. (Іууарпан, Bharathiraja, Baskar, & Kamalanaban, 2019) з використанням методології поверхні відгуку та штучної нейронної мережі оптимізували умови культивування *A. niger* PJR1 на відходах (160 г/л), які стали спонукаючим фактором для максимального виробництва яблучної кислоти ($92,61 \pm 1,86$ г/л) через 192 год. У той же час через рік згідно з подальшими експериментальними даними (Іууарпан, Baskar, Bharathiraja, & Gopinath, 2020) науковці змогли досягти посиленого виробництва яблучної кислоти ($131,48 \pm 3,4$ г/л через 288 год) методом реактивного періодичного культивування *in situ* штаму *A. niger* PJR1, а саме: коли відходи виробництва біодизелю знижувалися до рівня нижче 20 г/л, приблизно 140 г/л було додано до поживного середовища. Таким чином, реактивна екстракція в поєднанні з культивуванням *in situ* може стати ефективним методом для посиленого виробництва яблучної кислоти, у порівнянні із класичним способом культивування, при цьому за вищих концентрацій відходів.

За винятком використання мікроорганізмів виду *A. niger*, до синтезу яблучної кислоти також спроможні гриби виду *Ustilago trichophora*. За результатами праці (Zambanini, Sarikaya, & Kleineberg, 2016) концентрація яблучної кислоти ($5,3 \pm 0,3$ г/л), синтезованої *U. trichophora* TZ1 на відходах виробництва біодизелю (50 г/л) є значно нижчою, порівняно з титрами культивування грибів роду *Aspergillus* (Іууарпан, 2018; Іууарпан, 2019; Іууарпан, 2020), що потребує здійснення додаткових оптимізаційних операцій для кращої валоризації відходів у органічну кислоту. При цьому *U. trichophora* TZ1 є багатообіцяючим промислово придатним виробничим мікроорганізмом для отримання яблучної кислоти.

З опрацьованих досліджень видно, що оптимізація умов культивування мікроорганізмів на відходах виробництва біодизелю є перспективним напрямком для отримання різноманітних органічних кислот (лимонна, бурштинова, молочна та яблучна). Використання математичних методів оптимізації дозволяє досягти максимальних титрів продукції при мінімальних витратах ресурсів. Отримані результати свідчать про великий потенціал використання відходів виробництва біодизелю як дешевого і відновлюваного субстрату для виробництва цінних органічних кислот, що значно сприятиме екологічності біодизельної промисловості.

Узагальнені дані щодо органічних кислот, синтезованих на відходах виробництва біодизелю розміщені у таблиці 2.3.

Синтез органічних кислот як практично цінних метаболітів на відходах виробництва біодизелю

№	Назва метаболіту	Продуцент	Концентрація продукту	Концентрація відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі	Попередня очистка відходів виробництва біодизелю	Спосіб очистки відходів виробництва біодизелю	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Яблучна кислота	<i>Aspergillus niger</i> MTCC 281	62,54±0,75 г/л	60 г/л (Додаткове джерело вуглецю: сорбітол – 10 г/л, K ₂ CO ₃ – 5 г/л.)	+	Переетерифікація (для очищення від домішок, які містяться у відходах для отримання фракції гліцерину).	Iyyappan та ін., 2018
		<i>Ustilago trichophora</i> TZ1	5,3 ± 0,3 г/л	50 г/л	-	-	Zambanini, Sarikaya, & Kleineberg, 2016
		<i>Aspergillus niger</i> PJR1	92,61 ± 1,86 г/л	160 г/л	-	-	Iyyappan, Bharathiraja, Baskar, & Kamalanaban, 2019
		<i>Aspergillus niger</i> PJR1	131,48 ± 3,4 г/л	Коли відходи виробництва біодизелю знижувалися до рівня нижче 20 г/л, приблизно 140 г/л було додано до поживного середовища.	-	-	Iyyappan, Baskar, Bharathiraja, & Gopinath, 2020

Закінчення табл. 2.3

1	2	3	4	5	6	7	8
2	Лимонна та ізолимонна кислоти	<i>Yarrowia lipolytica</i> A101	14,2 ± 1,1 г/л	100 г/л	-	-	Rzechonek, Dobrowolski, Rymowicz, & Mirończuk, 2018
3	Лимонна кислота	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 8218	10 г/л	33 г/л	-	-	Giacomobono, Albergo, Valerio, Caporusso, & De Bari, 2022
		<i>Aspergillus niger</i> PD-66	69,7 г/л	114,14 г/л	-	-	Książek, Janczar-Smuga, Pietkiewicz, & Walaszczyk, 2023
4	Молочна кислота	Мікробний консорціум CJD-S (85,99% <i>Enterobacteriaceae</i> та 13,75% <i>Enterococcaceae</i>)	45,86 г/л	40 г/л (20 г/л неочищеного гліцерину підтримували шляхом його додавання під час культивування)	-	-	Jiang та ін., 2021
5	D-лактат	<i>Escherichia coli</i> EcoB-170	115 г/л	30 г/л (90 г/л неочищеного гліцерину було додано після повного вичерпання попередньо внесеного субстрату)	-	-	Wang, Liao, & Chiang, 2019
6	Бурштинова кислота	<i>Enterobacter</i> sp. LU1	69 г/л	60 г/л (Додаткове джерело вуглецю: пермеат сироватки – 60 г/л)	-	-	Podleśny та ін., 2019

2.4. Вітаміни, попередники вітамінів та вітаміноподібні речовини

Якщо розглянути нещодавно опубліковані літературні джерела щодо синтезу вітамінів, їх попередників та вітаміноподібних речовин, то можна зрозуміти, що гриби роду *Rhodotorula* є найбільш активним продуцентом даного класу сполук на відходах виробництва біодизелю (Szotkowski, 2023; Kot, 2019; Zhang, 2020; Bindea, 2018), тим більше зі здатністю до синтезу їх у вигляді комплексу. Варто зауважити, що чимало робіт відзначаються використанням ко-субстратів, до того ж іншим субстратом, відмінним від відходів біодизельної промисловості, є також вторинна сировина. Проте попри усі зазначені переваги, у більшості робіт відходи виробництва біодизелю піддають попередній очистці або стерилізації, що можна пояснити особливостями культивування штамів роду *Rhodotorula* на даному субстраті з метою посиленого виробництва.

Зважаючи на перспективу застосування ко-субстратів Szotkowski зі співавт. (Szotkowski та ін., 2023) розглянули використання суміші відходів виробництва біодизелю та кавової олії для культивування каротиногенних дріжджів штаму *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 020-002-026 з метою синтезу ними каротиноїдів, ергостерину, убіхінону та токоферолу. У результаті для великомасштабного вирощування *R. kratochvilovae* CCY 020-002-026 було обрано більш високе співвідношення відходи виробництва біодизелю:кавова олія як 25:75% з підживленням при якому спостерігалася підвищена здатність *R. kratochvilovae* CCY 020-002-026 до утилізації відходів, а також високі показники утворення каротиноїдів, ергостерину, убіхінону та токоферолу: $10,757 \pm 1,104$ мг/г сухої маси клітини, $9,783 \pm 1,198$ мг/г сухої маси клітини, $14,225 \pm 2,380$ мг/г сухої маси клітини, $9,203 \pm 0,489$ мг/г сухої маси клітини відповідно. Варто зазначити, що відходи виробництва біодизелю попередньо піддавали переестерифікації для очищення від домішок, та стерилізації для усунення контамінації.

У іншій роботі (Kot, Włazejak, & Kieliszek, 2019) була відзначена нижча концентрація каротиноїдів (6,46 мг/л), синтезованих *R. glutinis* LOCKR13, порівняно з *R. kratochvilovae* CCY 020-002-026. Проте варто зазначити, що при культивуванні штаму LOCKR13, відходи виробництва біодизелю були єдиним джерелом вуглецю та мали

вищу концентрацію (50 г/л) у поживному середовищі, ніж при культивування штаму ССҮ 020-002-026, що відзначається високим потенціалом для індустріалізації.

β -каротин, попередник вітаміну А, є одним з 600 різних каротиноїдів і використовується у функціональних продуктах харчування, кормових продуктах, медицині, косметичній промисловості. Останніми роками дослідження (Bindea, Rusu, & Rusu, 2018) показали, що серед мікроорганізмів, які демонструють найбільший потенціал для продукування β -каротину, є *Blakeslea trispora*, до того ж за використання відходів виробництва біодизелю як джерела вуглецю. Так результати, представлені у даній роботі вказують на те, що на вироблення β -каротину сильно впливає концентрація джерела вуглецю. Продукція β -каротину *B. trispora* збільшувалася при підвищенні концентрації відходів виробництва біодизелю до 60 г/л, після чого спостерігалось зниження кількості метаболіту зі збільшенням концентрації відходів. Найвищі показники синтезу β -каротину становили 13,5-14 г/100 г вологої біомаси. Варто підкреслити, що β -каротин, отриманий з біомаси, був очищений із виходом вище 99%. Отже, відходи виробництва біодизелю можна використовувати як альтернативне джерело вуглецю глюкозі в середовищі культивування для виробництва β -каротину, як харчової добавки.

Відходи виробництва біодизелю можна використовувати замість очищеного гліцерину для виробництва вітаміну К₂. У науковій роботі Zhang зі співавторами (Zhang, Wu, & Ren, 2020) визначили оптимальний склад поживного середовища за допомогою методології поверхні відгуку, як і автори статті (Iyyappan, Bharathiraja, Baskar, & Kamalanaban, 2019), для отримання вітаміну К₂ *Bacillus subtilis* Z-15. Результати показали, що оптимальне середовище було таким: 50 г/л відходів виробництва біодизелю, 3,0 % концентрації пептону соєвих бобів і 5,1 г/л дріжджового екстракту, відповідно до чого продукція вітаміну К₂ була збільшена до 45,11 ± 0,62 мг/л. Випробування у ферментері також довели, що використання відходів виробництва біодизелю не вплинуло ні на синтез вітаміну К₂, ні на ріст *B. subtilis* Z-15. Ці дослідження могли б закласти основу для зменшення забруднення відходами та більш екологічного виробництва вітаміну К₂.

Таким чином, використання відходів виробництва біодизелю у комбінації з іншими субстратами, такими як кавова олія, може значно підвищити потенціал мікроорганізмів для синтезу цінних біопродуктів, таких як каротиноїди, ергостерин, убіхінон, токоферол та вітамін К₂. Оптимізація співвідношення компонентів поживного середовища та концентрації відходів виробництва біодизелю, як, наприклад, при біосинтезі β-каротину *B. trispora* (Bindea, Rusu, & Rusu, 2018), сприяє підвищенню виходу продукції та зниженню витрат ресурсів.

Узагальнені дані щодо вітамінів, їх попередників та вітаміноподібних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю розміщені у таблиці 2.4.

2.5 Ліпіди

Загалом одні з найбільш часто зустрічних на наукових інтернет-джерелах статей є синтез суміші ліпідів (Bansal, 2020; Karayannis, 2023; Polburee, 2020 різними видами дріжджів на відходах виробництва біодизелю, порівняно із отриманням моноліпідного продукту: фосфоліпідів, фосфатидилхоліну (Szczerpańska та ін., 2022), докозагексаєнової кислоти (Bindea, Rusu, & Rusu, 2018).

Karayannis зі співавт. (Karayannis, Papanikolaou, Vatistas, Paris, & Chevalot, 2023) досліджували 5 штамів дріжджів (*Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula* sp., *Rhodospiridium toruloides* і *Cryptococcus curvatus*) дикого типу при культивуванні на нестерильних відходах виробництва біодизелю для отримання мікробних ліпідів. За отриманими науковцями результатами експериментів штам *C. curvatus* ATCC 20509 показав найвищу продукції ліпідів – 4,98 г/л за використання відходів виробництва біодизелю як джерела вуглецю у кількості 50 г/л. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів, що утворилися *C. curvatus* ATCC 20509 на відходах виробництва біодизелю, показав такі співвідношення пальмітинова кислота – С16:0=39,2%; пальмітолеїнова – С16:1=4,2%; олеїнова – С18:1=54,9%; лінолева – С18:2=8,8%; ліноленова – С18:3=0,5%.

Вітаміни, попередники вітамінів та вітаміноподібні речовини синтезовані на відходах виробництва біодизелю

№	Назва метаболіту	Продуцент	Концентрація продукту	Концентрація відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі	Попередня очистка відходів виробництва біодизелю	Спосіб очистки відходів виробництва біодизелю	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Ергостерин	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> CC Y 020-002-026	9,783 ± 1,198 мг/г сухої маси клітини	25 г/л (Додаткове джерело вуглецю: кавава олія – 75 г/л)	+	Переетерифікація (для очищення від домішок, які містяться у відходах для отримання фракції гліцерину), стерилізація (для усунення контамінації фракції гліцерину).	Szotkowski та ін., 2023
2	Каротиноїди	<i>Rhodotorula glutinis</i> LOCKR13	6,46 мг/л	50 г/л	-	-	Kot, Błażej, & Kieliszek, 2019
		<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> CC Y 020-002-026	10,757 ± 1,104 мг/г сухої маси клітини	25 г/л (Додаткове джерело вуглецю: кавава олія – 75 г/л)	+	Стерилізація (усунення контамінації поживного середовища відходами).	Szotkowski та ін., 2023
3	Убіхінон	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> CC Y 020-002-026	14,225 ± 2,380 мг/г сухої маси клітини	25 г/л (Додаткове джерело вуглецю: кавава олія – 75 г/л)	+	Стерилізація (усунення контамінації поживного середовища відходами).	Szotkowski та ін., 2023
4	Токоферол	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> CC Y 020-002-026	9,203 ± 0,489 мг/г сухої маси клітини	25 г/л (Додаткове джерело вуглецю: кавава олія – 75 г/л)	+	Стерилізація (усунення контамінації поживного середовища відходами).	Szotkowski та ін., 2023
5	Менахінон (K ₂)	<i>Bacillus subtilis</i> Z-15	45,11 ± 0,62 мг/л	50 г/л	-	-	Zhang, Wu, & Ren, 2020
6	β-каротин	<i>Blakeslea trispora</i>	13,5-14 г/100 г вологої біомаси	60 г/л	-	-	Bindea, Rusu, & Rusu, 2018

У роботі (Bansal та ін., 2020) було зафіксовано вищу продукцію ліпідів *R. mucilagenosa* PPL32 MTCC 25056 – 5,6 г/л за використання відходів виробництва біодизелю як джерела вуглецю у кількості 20 г/л. Проте відходи виробництва біодизелю піддали відновленню з метою очищення їх від вільних жирних кислот, що вимагає додаткових витрат на додаткові операції, ніж у разі культивування *C. curvatus* ATCC 20509 (Karayannis, Papanikolaou, Vatistas, Paris, & Chevalot, 2023). Жирнокислотний склад клітинних ліпідів, що утворилися *R. mucilagenosa* PPL32 MTCC 25056 на відходах виробництва біодизелю, був теж дещо вужчий, ніж у попередній праці, та мав такі співвідношення: олеїнова кислота – C18:1=61,88%; лінолева – C18:2=16,17%; ліноленова – C18:3=1,03%.

Для посиленого виробництва ліпідної сировини за внесення високих концентрацій (81,54 г/л) відходів виробництва біодизелю *Boonyarit* зі співавт. (Boonyarit, Polburee, Khaenda, Zhao, & Limtong, 2020) також намагалися оптимізувати культивування *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-SP314 за допомогою методології «один фактор за раз» разом із методом поверхні відповіді, що в кінці дало змогу отримати високий вихід ліпідів – 15,85 г/л із широким жирнокислотним складом: C14:0, міристинова кислота; C16:0, пальмітинова кислота; C18:0, стеаринова кислота; C18:1, олеїнова кислота; C18:2, лінолева кислота; C18:3, α -ліноленова кислота). Таким чином, *R. fluvialis* DMKU–SP314 має багатообіцяючу здатність перетворювати відходи біодизельного палива в мікробні ліпіди з високим титром при цьому у екологічно вигідних умовах.

Докозагексаєнова кислота є важливим структурним компонентом клітинної мембрани у різних тканинах людини, будучи поліненасиченою омега-3 жирною кислотою. Тому паралельно з отриманням β -каротину *B. trispora* у роботі (Bindea, Rusu, & Rusu, 2018) Bindea зі співавт. паралельно дослідили синтез докозагексаєнової кислоти *Schizochytrium limacinum* SR21 на відходах виробництва біодизелю. Результати продемонстрували, що за оптимізованих умов поживного середовища (25°C; концентрація відходів виробництва біодизелю становила 90 г/л), показники виходу докозагексаєнової кислоти становили 400-420 г/100 г вологої біомаси, які є аналогічні за використання 70 г/л очищеного гліцерину як джерела вуглецю. Таким чином, відходи

виробництва біодизелю можуть успішно замінити очищений гліцерин, тим самим зменшуючи витрати на культивування *S. limacinum* для отримання біомаси та цінного метаболіту – докозагексаєнової кислоти.

Шляхом вдосконалення генетичної інформації різноманітних штамів мікроорганізмів можна досягти підвищення ефективності синтезу біопродуктів, що відкриває нові перспективи для створення більш продуктивних та стійких до негативних умов штамів. Автори статті (Szczepańska та ін., 2022) встановили, що вид *Y. lipolytica* має здатність до синтезу не лише органічних кислот, а й – ліпідів, а саме: фосфоліпідів та фосфатидилхоліну. Їх дослідження було спрямоване на створення штаму з покращеною продукцією фосфоліпідів, з особливим акцентом на підвищений біосинтез фосфатидилхоліну. Так після проведення кількох генетичних модифікацій було створено штам *Y. lipolytica* PS08, який при заміщенні глюкози відходами виробництва біодизелю продукував фосфоліпідів та фосфатидилхолін майже на 280% краще, а саме 653,7 мг/л та 352,6 мг/л відповідно, що в котрий раз доводить перспективу використання відходів виробництва біодизелю *Y. lipolytica* для потенційного виробництва як органічних кислот, так і фосфоліпідів.

З вище описаної інформації, можна узагальнити, що штами дріжджів, такі як *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridiobolus fluvialis* і *Schizochytrium limacinum*, демонструють високу продуктивність у синтезі ліпідів на відходах біодизельної промисловості за оптимізації умов культивування і складу поживних середовищ. При цьому, врахування жирнокислотного складу отриманих ліпідів та інших параметрів дозволяє ефективно планувати й контролювати процеси синтезу.

Узагальнені дані щодо ліпідів, синтезованих на відходах виробництва біодизелю розміщені у таблиці 2.5.

Відходи виробництва біодизелю як перспективний субстрат у мікробному синтезі ліпідів

№	Назва метаболіту	Продуцент	Концентрація продукту	Концентрація відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі	Попередня очистка відходів виробництва біодизелю	Спосіб очистки відходів виробництва біодизелю	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Фосфоліпіди	<i>Yarrowia lipolytica</i> PS08	653,7 мг/л	100 г/л	-	-	Szczepańska та ін., 2022
2	Фосфатидилхолін	<i>Yarrowia lipolytica</i> PS08	352,6 мг/л	100 г/л	-	-	Szczepańska та ін., 2022
3	Ліпіди (олеїнова кислота – 61,88%, лінолева кислота – 16,17%) і ліноленова кислота – 1,03%)	<i>Rhodotorula mucilagenosa</i> IPL32 MTCC 25056	5,6 г/л	20 г/л	+	Відновлення (для очищення від вільних жирних кислот та отримання фракції гліцерину).	Bansal та ін., 2020
4	Ліпіди (C16:0=39,2%; C16:1=4,2%; C18:1=54,9%; C18:2=8,8%; C18:3=0,5%)	<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	4,98 г/л	50 г/л	-	-	Karayannis, Papanikolaou, Vatistas, Paris, & Chevalot, 2023

Закінчення табл. 2.5

1	2	3	4	5	6	7	8
5	Ліпіди (C14:0, міристинова кислота; C16:0, пальмітинова кислота; C18:0, стеаринова кислота; C18:1, олеїнова кислота; C18:2, лінолева кислота; C18:3, α-ліноленова кислота)	<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-SP314	15,85 г/л	81,54 г/л	-	-	Boonyarit, Polburee, Khaenda, Zhao, & Limtong, 2020
6	Докозагексаєнова кислота	<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	400-420 г/100 г вологої біомаси	90 г/л	-	-	Bindea, Rusu, & Rusu, 2018

2.6 Полімери

Розглянувши біосинтез полімерів на відходах виробництва біодизелю, можна відзначити, що найбільша кількість праць базується саме на виробництві полігідроксисилканоатів (РНА) (Borrero-de Асуїа, 2021; Lascu, 2022; Dubey, 2021; Mohd Zain, 2021) та целюлози (Lee, 2021; Ho Jin, 2019; Dikshit, 2020; Cannazza, 2021), рідше спостерігається отримання полі- γ -глутамінової кислоти (Zhan, Sheng, & Wang, 2018) та інших полісахаридів (Wang, Ning, Gao, He, & Zhang, 2019). Чимало робіт по отриманню РНА характеризуються застосуванням методологією поверхні відгуку для посилення виробництва полігідроксисилканоатів на відходах виробництва біодизелю, тоді як у разі отримання целюлози автори відзначали використання генетичних модифікацій.

Наразі багато компаній виробляють РНА у великих масштабах, однак промислове виробництво РНА є дорогим, враховуючи високі експлуатаційні витрати через вуглецевий субстрат і подальшу переробку. Відповідно до чого Borrero-de Асуїа зі співавт. (Borrero-de Асуїа, Rohde, Saldias, & Poblete-Castro, 2021) встановили, що *P. putida* КТ2440 є підходящою платформою для їх отримання, використовуючи при цьому відходи виробництва біодизелю. Так штам *P. putida* КТ2440 був відзначений посиленням виробництвом РНА (9,7 г/л) з концентрацією відходів у середовищі культивування 20 г/л, що дає перспективу більш економічному і ефективному способу виробництва полігідроксисилканоатів.

Оскільки відходи виробництва біодизелю є досить токсичним субстратом, тому пріоритетом у роботі (Dubey, & Mishra, 2021) був збір зразків з екстремальних середовищ для виділення виду бактерій, адаптованих до таких суворих умов, які здатні продукувати РНА на відходах виробництва біодизелю. Таким осередком стали солончаки, з яких було виділено *Halomonas daqingensis*, потенційний продуцент РНА з максимальною продуктивністю $0,236 \pm 0,003$ г/100 мл у присутності відходів у концентрації 30 г/л.

Як і у вище описаних експериментах, автори статті (Mohd Zain, Paramasivam, Tan, Lim, & Lee, 2021) також скористалися методологією поверхні відгуку для опти-

мізації умов культивування ще одного штаму бактерій, здатних продукувати полігідроксиалканоати на відходах виробництва біодизелю, а саме: *Burkholderia serapsia* ВРТ1213. Так за оптимальних умов для росту на накопичення РНА штам ВРТ1213 упродовж 72 годин на поживному середовищі з вмістом відходів виробництва біодизелю 20 г/л та інтенсивністю перемішування 300 об/хв синтезував 3,35 г/л РНА, концентрація яких була втричі вища порівняно з неоптимізованими умовами.

Морські бактерії *Photobacterium ganghwense* С2.2 представлені як перспективні продуценти РНА, які здатні використовувати відходи виробництва біодизелю, у дослідженні (Lascu та ін., 2022). Виявлені у них метаболічні шляхи відповідно до геномних і фенотипових даних вказували на придатність сечовини як джерела азоту, а головне – на здатність штаму засвоювати та перетворювати відходи виробництва біодизелю. Порівняння очищеного гліцерину та відходів виробництва біодизелю вказує, що максимальний вміст РНА є майже ідентичний при культивуванні *P. ganghwense* С2.2 через 120 год (на відходах виробництва біодизелю – 2,066 г/л ($\pm 0,273$), на очищеному гліцерині – 2,191 г/л ($\pm 0,087$)). Таким чином, використання відходів виробництва біодизелю та сечовини як дешевих субстратів біосинтезу становлять економічно ефективну систему біотехнологічного процесу на заміну очищеному гліцерину.

Ще одним цікавим метаболітом з багатообіцяючими перспективами є бактеріальна целюлоза, яка у порівнянні з целюлозою рослинного походження має унікальні властивості та структуру, такі як чудова механічна міцність, здатність до біологічного розкладання, висока чистота та волого утримуюча властивість, до того ж вона не потребує додаткового процесу попередньої обробки, і відразу готова до використання. Но зі співавт. (Но Jin, Lee, Kim, Choi, & Park, 2019) також порівнювали продуктивність бактеріальної целюлози при використанні відходів виробництва біодизелю та очищеного гліцерину *Gluconacetobacter xylinus* КССМ 41431. Відповідно до чого були зафіксовані схожі показники синтезу целюлози на обох субстратах у концентрації 20 г/л (на відходах – 6,95 г/л, на очищеному гліцерині – 7,35 г/л).

Крім того, інше дослідження (Cannazza та ін., 2021) продемонструвало здатність оцтовокислих бактерій *Komagataeibacter* spp. також синтезувати целюлозу,

проте на мінімальному поживному середовищі, яке містить очищений гліцерин і відходи виробництва біодизелю (20 г/л). Даний ізолят продемонстрував аналогічні показники синтезу бактеріальної целюлози на обох субстратах, а саме: $2,1 \pm 0,1$ г/л на відходах та $2,2 \pm 0,1$ г/л на очищеному гліцерині.

У науковій праці (Dikshit, & Kim, 2020) було відмічено схожу продуктивність *Gluconobacter xylinus* KCCM 41431 бактеріальної целюлози (2,93 г/л) відповідно до синтезуючих можливостей *Komagataeibacter* spp. (Cannazza та ін., 2021), проте концентрація відходів виробництва біодизелю як джерела вуглецю була майже втричі вищою (50 г/л), що вказує на підвищений рівень толерантності клітин *Gluconobacter xylinus* KCCM 41431 до високих концентрацій відходів виробництва біодизелю.

Нещодавні дослідження (Lee та ін., 2021) представили новий клас бактеріальної целюлози, а саме – наноцелюлозу, синтезовану оцтовокислими бактеріями *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM15973, яка характеризується аналогічними показниками, як і звичайна бактеріальна целюлоза, до того ж володіє високою кристалічністю, проте все ж синтез такого продукту є доволі затратний. Саме тому одним із логічних рішень для здешевлення виробництва наноцелюлози можуть слугувати відходи промисловості. Так Lee зі співавторами (Lee та ін., 2021) вирішили внести 20 г/л відходів виробництва біодизелю у середовище культивування штаму DSM15973, але оскільки домішки, що містяться у субстраті є деяким перешкоджаючим фактором, відходи виробництва біодизелю піддали ультрацентрифугуванню та розбавленню для зменшення концентрації токсичних сполук, у результаті чого практичний вихід наноцелюлози становив 6,4 г/л. Таким чином, пряма валоризація відходів біодизельної промисловості для виробництва наноцелюлози підвищує економічність процесу та дозволяє знизити собівартість продукту.

Завдяки вдалим генетичним модифікаціям у праці (Zhan, Sheng, & Wang, 2018) було змінено метаболічний шлях *Bacillus licheniformis* WX-02, щоб покращити ефективність асиміляції відходів виробництва біодизелю і постачання НАДФН для посиленого синтезу полі- γ -глутамінової кислоти, природного полімеру з хорошим потенціалом для застосування у медичній, харчовій та косметичній промисловості. Викори-

стання глюкози та глютамату підвищує вартість кінцевого продукту, тому автори вважали за перспективу заміни даного субстрату на дешевший – відходи виробництва біодизелю (78 г/л), що в результаті стимулювало високу продуктивність полі- γ -глутамінової кислоти – 18,41 г/л, яка перевищувала показники синтезу дикого штаму у 1,5 рази. Варто зазначити, що відходи піддавали попередньому очищенню, обробці активованим вугіллям.

Wang зі співавт. (Wang, Ning, Gao, He, & Zhang, 2019) довели кращу здатність ендофітного гриба *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 утилізувати неочищені відходи виробництва біодизелю, порівняно з глюкозою, для виробництва полісахаридів. Результати показали, що титри полісахаридів, синтезованих на глюкозі та відходах виробництва біодизелю становили 1,85 та 2,6 г/л відповідно. Полісахарид, отриманий з відходів виробництва біодизелю, включає (мкмоль/л): галактозу – 8,16, глюкозу – 43,77, манозу – 5,84, глюкуронову кислоту – 0,43, склад якого може змінюватися залежно від метаболічних шляхів та енергозабезпечення *C. globosum* CGMCC 6882.

Отже, з нещодавно опублікованих експериментальних результатів можна підсумувати, що на основі відходів виробництва біодизелю синтезується доволі широкий спектр полімерів з багатообіцяючими властивостями. Так, наприклад, можна відмітити високу продуктивність синтезу полігідроксиалканоатів *P. putida* KT2440 – 9,7 г/л (Borrero-de Acuña, Rohde, Saldias, & Poblete-Castro, 2021), полі- γ -глутамінової кислоти *B. licheniformis* WX-02 – 18,41 г/л (Zhan, Sheng, & Wang, 2018), бактеріальної целюлози *G. xylinus* KCCM 41431 – 6,95 г/л (Ho Jin, Lee, Kim, Choi, & Park, 2019) та наноцелюлози *K. sucrofermentans* DSM15973 – 6,4 г/л (Lee та ін., 2021). Така інтеграція відходів виробництва біодизелю у біотехнологічні процеси не лише сприяє підвищенню продуктивності, але й зменшенню негативного впливу на навколишнє середовище, економічному використанню ресурсів, а найголовніше – зниженню собівартості високоякісних метаболітів.

Узагальнені дані щодо полімерів, синтезованих на відходах виробництва біодизелю розміщені у таблиці 2.6.

2.7 Поверхнево-активні речовини

Частина інформації, що представлена у доступних наукових джерелах щодо використання відходів виробництва біодизелю, присвячена дослідженню особливостям біосинтезу мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР), а саме: рамноліпідам (Zhao, 2021; Zhao, 2021; Bezerra, 2019; Baskaran, 2021) та ліпопептидам (Janek, 2021; Biniarz, 2018; Ciurko, 2023), які характеризуються достатньо високим практичним виходом. Крім того, як видно з інформації, найбільш часто використовуваним продуцентом для отримання даного класу сполук є бактерії виду *Pseudomonas aeruginosa*, і лише синтез сурфактину було сконструйовано за допомогою виду *Bacillus subtilis* (Janek та ін., 2021). Зауважу, що у деяких працях (Baskaran, 2021; Ciurko, 2023) відходи піддавали попередньому очищенню, проте переважній більшості робіт притаманні високі концентрації ПАР, уникаючи дані операції.

Полімери як практично цінні метаболіти, синтезовані на відходах виробництва біодизелю

№	Назва метаболіту	Продуцент	Концентрація продукту	Концентрація відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі	Попередня очистка відходів виробництва біодизелю	Спосіб очистки відходів виробництва біодизелю	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Полі- γ -глутамінова кислота	<i>Bacillus licheniformis</i> WX-02	18,41 г/л	78 г/л (Лужний гліцерин)	+	Обробка активованим вугіллям (для очищення відходів від забруднюючих домішок для отримання фракції гліцерину).	Zhan, Sheng, & Wang, 2018
2	Полігідроксиалканоати	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	9,7 г/л	20 г/л	-	-	Borrero-de Acuña, Rohde, Saldias, & Poblete-Castro, 2021
		<i>Photobacterium ganghwense</i> C2.2	2,066 г/л	20 г/л	-	-	Lascu та ін., 2022
		<i>Halomonas daqingensis</i>	0,236 \pm 0,003 г/100 мл	30 г/л	-	-	Dubey, & Mishra, 2021
		<i>Burkholderia ceracia</i> BPT1213	3,35 г/л	20 г/л	-	-	Mohd Zain, Paramasivam, Tan, Lim, & Lee, 2021

1	2	3	4	5	6	7	8
3	Полісахарид складається з: галактози, глюкози, манози, глюкуронової кислоти.	<i>Chaetomium globosum</i> CGMCC 6882	2,6 г/л. Полісахарид складається з (мкмоль/л): галактози – 8,16, глюкози – 43,77, манози – 5,84, глюкуронової кислоти – 0,43.	40 г/л	-	-	Wang, Ning, Gao, He, & Zhang, 2019
4	Нано-целюлоза	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> DSM15973	6,4 г/л	20 г/л	+	Розбавлення, центрифугування (для очищення від домішок та залишків розчину, які містяться у розбавленому 20%-му розчині відходів для отримання фракції гліцерину).	Lee та ін., 2021
5	Целюлоза	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> KCCM 41431	6,95 г/л	20 г/л	-	-	Ho Jin, Lee, Kim, Choi, & Park, 2019
		<i>Gluconobacter xylinus</i> KCCM 41431	2,93 г/л	50 г/л	-	-	Dikshit, & Kim, 2020
		<i>Komagataeibacter rhaeticus</i> ENS9b	2,1 ± 0,1 г/л	20 г/л	-	-	Cannazza та ін., 2021

Більшість ПАР отримують з використанням дорогих поживних середовищ і процесів очищення, що обмежує їх широке промислове використання. Сталість цих виробничих процесів може бути досягнута, зокрема, за рахунок використання дешевих субстратів, що знаходяться серед сільськогосподарських і харчових відходів або побічних продуктів. Відповідно до цього у дослідженні (Janek та ін., 2021) відходи виробництва біодизелю були оцінені як потенційне недороге джерело вуглецю для зниження витрат на виробництво ПАР *B. subtilis* #309. Поживне середовище, що містить відходи виробництва біодизелю (40 г/л), привело до найкращого виробництва ПАР, досягнувши концентрації близько 1,3 г/л. Застосування цієї сировини дозволило в п'ять разів збільшити біосинтез ПАР в порівнянні з аналогічним середовищем з очищеним гліцерином в якості субстрату. Крім того, поверхнево-активна речовина, отримана в даній роботі, була ідентифікована під назвою – сурфактин, яка продемонструвала хорошу стабільність у широкому діапазоні рН, солоності та температури, що свідчить про її потенціал для кількох застосувань у біотехнології.

Рамноліпіди є найбільш вивченими біосурфактантами в даній час. Zhao зі співавт. (Zhao, Wu, & Wang, 2021) використовували різні субстрати (відходи виробництва біодизелю, глюкозі та соєвій олії) для анаеробного росту штаму *Pseudomonas aeruginosa* FA1 з метою синтезу рамноліпідів. Вони виявили, що відходи виробництва біодизелю (40 г/л) використані як джерело вуглецю були найефективнішим субстратом для синтезу рамноліпідів (244 мг/л) під час анаеробного росту штаму *P. aeruginosa* FA1, порівняно з культивуванням на глюкозі та соєвій олії, а поверхневий натяг повітря-вода зменшився з 72,6 мН·м⁻¹ до менше 29 мН·м⁻¹.

Baskaran зі співавт. (Baskaran та ін., 2021) також оцінили потенціал використання даного субстрату *P. aeruginosa* RS6 для виробництва рамноліпідів, де максимальний синтез становив 2,73 г/л з можливістю зниження поверхневого натягу води з 72,13 мН·м⁻¹ до 29,4-30,4 мН·м⁻¹. Варто зауважити, що концентрація ПАР, вироблених штамом FA1 (Zhao, Wu, & Wang, 2021), є нижчою у 11 разів, порівняно із штамом RS6, проте відходи виробництва біодизелю були піддані попередньому багатостадійному очищенню (фільтрування, обробка конц. H₂SO₄, нагрівання, центрифугування),

що значно ускладнює процес виробництва, а також підвищує собівартість кінцевого метаболіту, порівняно із застосуванням неочищеного субстрату.

Схожі результати були зафіксовані у роботі (Zhao та ін., 2021), де штам *P. aeruginosa* Prh1AB продемонстрував продуктивність рамноліпідів у кількості 2,87 г/л на відходах виробництва біодизелю з концентрацією 60 г/л у поживному середовищі, до того ж які не потребували додаткових операцій щодо очищення субстрату, як у праці (Zhao, Wu, & Wang, 2021). Крім того, вища концентрація відходів у середовищі вказує на покращену толерантність *P. aeruginosa* Prh1AB до їх утилізації.

Найвища концентрація рамноліпідів (11 г/л), синтезованих *P. aeruginosa* TGC01 на неочищених відходах виробництва біодизелю (60 г/л), серед розглянутих літературних джерел була відмічена у дослідженні (Bezerra, Gomes, Silva, Sarubbo, & Ribeiro, 2019). Рамноліпіди були здатні знизити поверхневий натяг води з $72 \text{ мН}\cdot\text{м}^{-1}$ до $27 \text{ мН}\cdot\text{м}^{-1}$ з критичною концентрацією міцел 100 мг/л і стабільним індексом емульсії (вище 60%) при ферментативному гідролізі.

Визначення критичних параметрів продукуючої культури, важливих для виробництва ліпопептидів, та їх високих виходів може призвести до зниження собівартості виробництва цих молекул. Так у роботі (Biniarz, Coutte, & Gancel, 2018) повідомляють про успішну високопродуктивну оптимізацію поживного середовища та умов для ефективного виробництва ліпопептиду псевдофактину *P. fluorescens* BD5. Використовуючи методологію Плакетта-Бурмана та центрального композитного проектування, автори визначили критичні фактори, важливі для ефективного виробництва псевдофактину, головним чином високу концентрацію відходів виробництва біодизелю (100 г/л), у результаті чого кінцева продуктивність псевдофактину становила $1187 \pm 13,0$ мг/л.

У роботі (Сіурко та ін., 2023) також було показано, що відходи виробництва біодизелю (40 г/л), як єдине джерело вуглецю та енергії, мають великий потенціал щодо підвищення росту клітин виду *Pseudomonas*, а також впливають на синтез поверхнево-активних речовин (ПАР), а саме ліпопептидів. Про продукцію ПАР свідчило зниження поверхневого натягу, який за оптимальних умов культивування знизився з

72,13 мН м⁻¹ до 29,4–30,4 мН м⁻¹. За даними інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR) та мас-спектрометрії з електророзпиленням іонізації (ESI-MS) ліпопептид ідентифікували як віскозин, критична концентрація міцел яких становила 20 мг/л. Відходи виробництва біодизелю попередньо піддавали стерилізації для усунення контамінації поживного середовища.

Таким чином, у результаті досліджень, проведених різними науковими групами, було показано високий потенціал використання відходів виробництва біодизелю для синтезу поверхнево-активних речовин, зокрема рамноліпідів та ліпопептидів. Інформації щодо синтезу ПАР різними штамми *P. aeruginosa*, а також *B. subtilis*, наведено чимало, концентрації відходів виробництва біодизелю (10-100 г/л) у поживних середовищах були достатньо високими, при цьому концентрації ПАР варіювалися, наприклад, у дослідженні (Zhao, Wu, & Wang, 2021) наведено, що за наявності 40 г/л відходів виробництва біодизелю концентрація рамноліпідів становила 244 мг/л і була значно нижчою, порівняно з показниками, наведеними у статті (Bezerra, Gomes, Silva, Sarubbo, & Ribeiro, 2019) – 11 г/л за наявності 60 г/л субстрату. Варто зазначити, що у більшості працю відходи біодизельної промисловості не піддавали попередній очистці, зважаючи на значну токсичність, що в разі спрощує процес виробництва, а найголовніше – знижує собівартість ПАР.

Узагальнені дані щодо поверхнево-активних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю розміщені у таблиці 2.7.

Відходи виробництва біодизелю як джерело вуглецю для синтезу поверхнево-активних речовин

№	Назва метаболіту	Продуцент	Концентрація продукту	Концентрація відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі	Попередня очистка відходів виробництва біодизелю	Спосіб очистки відходів виробництва біодизелю	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FA1	244 мг/л	40 г/л	-	-	Zhao, Wu, & Wang, 2021
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Prh1AB	2,87 г/л	60 г/л	-	-	Zhao та ін., 2021
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC01	11 г/л	60 г/л	-	-	Bezerra, Gomes, Silva, Sarubbo, & Ribeiro, 2019
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RS6	2,73 г/л	10 г/л	+	Фільтрування (для видалення домішок у відходах). Обробка конц. H ₂ SO ₄ . Нагрівання (для видалення метанолу та води). Центрифугування (для отримання надлишкової рідини).	Baskaran та ін., 2021
2	Сурфактин	<i>Bacillus subtilis</i> # 309	1,3 г/л	40 г/л	-	-	Janek та ін., 2021
3	Псевдо-фактин	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BD5	1187 ± 13,0 мг/л	100 г/л	-	-	Biniarz, Coutte, & Gancel, 2018
4	Віскозин	<i>Pseudomonas antarctica</i> 28E	Критична концентрація міцел 20 мг/л	40 г/л	+	Стерилізація (усунення контамінації поживного середовища відходами).	Сіурко та ін., 2023

2.8 Інші продукти мікробного синтезу

Окрім вище описаних груп практично цінних продуктів мікробного синтезу, поодинокі зустрічалися доволі «екзотичні» метаболіти (кетози, ферменти, біоводень, нейроактивні сполуки, фітогормони, модифіковані амінокислоти, антимікробні сексвітерпени), отримані із залученням сучасних методів оптимізації та розробки досліджень, які теж мають значний майбутній потенціал у різних галузях промисловості.

Шляхом вдосконалення генетичної інформації різноманітних штамів мікроорганізмів можна досягти підвищення ефективності синтезу біопродуктів, що відкриває нові перспективи для створення більш продуктивних та стійких до негативних умов штамів. Так, наприклад, Rakicka-Pustułka зі співавт. (Rakicka-Pustułka та ін., 2022) піддали генетичній модифікації дріжджі виду *Yarrowia lipolytica*, які здатні виробляти кінуренову кислоту – дуже цінну сполуку, яка діє як нейропротекторний і антиоксидантний агент у людини, у більш високих концентраціях, використовуючи відходи виробництва біодизелю. Отримані результати свідчать про збільшення виробництва кінуренової кислоти мутантним штамом *Y. lipolytica* A-1-1.1.31 GUT1/1 з використанням 40 г/дм³ відходів виробництва біодизелю і становлять 357,9 мг/кг сухої маси клітини, кількість якої є найвищою серед усіх трансформантів.

У іншій роботі Robert зі співавт. (Robert та ін., 2021) описали вплив дозування генів (CalB) *Candida antarctica* на продукцію ліпази В у метилотрофних дріжджах *Komagataella phaffii* X-33 при високій щільності у простому середовищі, що містить відходи виробництва біодизелю як єдиного джерела вуглецю. Штам з трьома копіями гена LipB (оптимізованої версії гена, що кодує CalB) досяг більш високого виходу фермента – 48 760 Од/л, що в 2,3 рази вище, ніж штам з однією копією без впливу на ріст.

Ще один важливий метаболіт було отримано у роботі (Chan та ін., 2021) при оптимізації поживного середовища за допомогою простерилізованих відходів виробництва біодизелю у кількості 20 г/л культивуванням роду *Klebsiella pneumoniae* для отримання біоводню. Так при оптимізованій інтенсивності опромінення видимим сві-

тлом та концентрації гібридно органічно-мікробної системи з безметалевими гідротермальними вуглецевими мікросферами було посилено виробництво біоводню *K. pneumoniae*. Відповідно до цього протягом 3-ох годин було згенеровано 1020 мкмоль/л, що продемонструвало доцільність використання гібридної системи органіки та мікроорганізмів як ефективної технології перетворення відходів на енергію.

У дослідженні (Wang та ін., 2020) автори паралельно з отриманням 1,3-пропандіолу штамом *C. butyricum* DL07 вивчали також можливість синтезу біоводню. Так, за початкової концентрації відходів виробництва біодизелю 40 г/л та контролю концентрації залишкових відходів на рівні близько 20 г/л, спостерігали синтезу біоводню у кількості 15,9 ммоль/л, що нижче порівняно з продуктивністю *K. pneumoniae* (Chan та ін., 2021), але економніше без витрат на попередню стерилізацію субстрату.

Використання методології RSM для продукування індол-3-оцтової кислоти, найпоширенішої рослинним гормоном класу ауксинів, на відходах виробництва біодизелю також було показано у роботі (Bunsangiam, Thongpae, & Limtong, 2021). Так отримання базидіоміцетними дріжджами *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-CP293 індол-3-оцтової кислоти було оптимізовано спершу у колбі з використанням економічно ефективного середовища, що містить 45 г/л відходів виробництва біодизелю і 0,55% кормового 1-триптофану, що призвело до збільшення виробництва індол-3-оцтової кислоти та зниження вартості в 3,6 раза порівняно з тими, що були отримані з неоптимізованим середовищем. Після виробництво було розширено до біореактора об'ємом 15 л та пілотного масштабу об'ємом 100 л. Таким чином, виробництво індол-3-оцтової кислоти було підвищене до концентрації 3569,32 мг/л за пілотною шкалою.

Використовуючи методологію Плакетта-Бурмана та центрального композитного проектування, як у роботі (Biniarz, Coutte, & Gancel, 2018), Liu зі співавт. (Liu, Liu, Zhang, Liu, & Zheng, 2020) провели оптимізацію умов культивування *Escherichia coli* W3110, яка дозволила підвищити синтез ще однієї високо цінної сполуки О-ацетилгомосерину до 7,01 г/л за внесення відходів виробництва біодизелю у кількості 40 г/л. Отже, за рахунок відповідних оптимізуючих маніпуляцій, було посилено виробництво О-ацетилгомосерину на відходах виробництва біодизелю *E.coli* W3110, що може слугувати для його економічно вигідної індустріалізації у майбутньому.

Окрім виробництва фермента ліпази В *K. phaffii* X-33 (Robert та ін., 2021), вдалося знайти літературу щодо експериментальних досліджень синтезу β -глюкозидази, яка є основним вузьким місцем для промислової деградації рослинної біомаси. У цій роботі, попередньо очищені переестерифікацією, відходи виробництва біодизелю (20 г/л) були випробувані як джерело вуглецю для гриба *Talaromyces amestolkiae* з метою отримання ферментних коктейлів, збагачених β -глюкозидазою. Так, було виявлено приблизно 11 Од/мл β -глюкозидази, що становить основну целюлозолітичну активність, який був успішно використаний для доповнення базального комерційного целюлозолітичного коктейлю (Celluclast 1,5 л) для оцукрювання попередньо обробленої пшеничної соломи, підтверджуючи, що навіть промислові відходи, які важко експлуатуються, наприклад, відходи біодизельної промисловості, можуть бути використані як вторинна сировина для виробництва цінних ферментативних препаратів в рамках економіки замкнутого циклу.

Dikshit зі співавт. (Dikshit, Kharmawlong, & Moholkar, 2018) повідомляли про культивування *Gluconobacter oxydans* МТСС 904 на поживному середовищі з відходами виробництва біодизелю (20 г/л) з метою отримання дигідроксиацетону, який є важливим компонентом у косметичних засобах та як прекурсор у фармацевтиці. Експериментальні дані показали, що через значний вміст токсичних сполук у субстраті відбувається інгібування клітин *G. oxydans* МТСС 904, відповідно до чого спостерігається менший вихід дигідроксиацетону. Так для усунення негативного впливу домішок, що містяться у відходах, було проведено їх переестерифікацію. Крім того, дослідники змогли підвищити рівень толерантності штаму МТСС 904 до відходів виробництва біодизелю за рахунок обробки ультразвуком, що збільшило споживання джерела вуглецю на 60–84% без істотних змін у морфології клітин, а найголовніше – практичний вихід дигідроксиацетону за таких умов склав 11,64 г/л.

У іншій праці (Yao, Li, & Feng, 2019) кінцева концентрація дигідроксиацетону, отриманого *E. coli* HJ06PN на неочищених відходах біодизельної промисловості, становила 2,81 г/л. Зважаючи на те що вміст джерела вуглецю у даному дослідженні є удвічі нижчий (10 г/л), це пояснює й відповідно нижчий практичний вихід дигідроксиацетону, ніж у роботі (Dikshit, Kharmawlong, & Moholkar, 2018).

Таким чином, розглянуті дослідження підтверджують великий потенціал використання відходів виробництва біодизелю для отримання корисних біопродуктів, таких як ферменти, кетози, біоводень, фітогормони, нейроактивні сполуки тощо. Оптимізація умов культивування та генетична модифікація продуцентів відіграють ключову роль у досягненні високих титрів. Переетерифікація та інші методи попередньої обробки відходів можуть покращити їх біологічну доступність для мікроорганізмів для отримання даних продуктів, проте дещо підвищити їх кінцеву вартість виробництва.

Узагальнені дані щодо інших метаболітів, синтезованих на відходах виробництва біодизелю розміщені у таблиці 2.8.

Інші продукти мікробного синтезу, отримані на відходах виробництва біодизелю

№	Група продуктів мікробного біосинтезу	Назва метаболіту	Продуцент	Концентрація продукту	Концентрація відходів виробництва біодизелю у поживному середовищі	Попередня очистка відходів виробництва біодизелю	Спосіб очистки відходів виробництва біодизелю	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Кетози	Дигідроксиацетон	<i>Gluconobacter oxydans</i> MTCC 904	11,64 г/л	20 г/л	+	Переетерифікація (для очищення від домішок, які містяться у відходах для отримання фракції гліцерину).	Dikshit, Kharmawlong, & Moholkar, 2018
		Ацетол (дигідроксиацетон)	<i>Escherichia coli</i> HJ06PN	2,81 г/л	10 г/л	-	-	Yao, Li, & Feng, 2019
2	Ферменти	В-глюкозидаза	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	11 Од/мл β-глюкозидази	20 г/л	+	Переетерифікація (для очищення від домішок, які містяться у відходах для отримання фракції гліцерину).	Méndez-Líter, de Eugenio, Hakalin, Prieto, & Martínez, 2021
		Ліпаза В	<i>Komagataella phaffii</i> X-33	48 760 Од/л	100 г/л	-	-	Robert та ін., 2021

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	Альтернативні джерела енергії	Біоводень	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1020 мкмоль/л	20 г/л	+	Стерилізація (усунення контамінації поживного середовища відходами).	Chan та ін., 2021
			<i>Clostridium butyricum</i> DL07	15,9 ммоль/л	40 г/л (20 г/л гліцерину підтримували шляхом його додавання під час культивування)	-	-	Wang, Zhou, & Liu, 2022
4	Нейроактивні сполуки	Кінуренова кислота	<i>Yarrowia lipolytica</i> A-1-1.1.31 GUT1/1	357,9 мг/кг сухої маси клітини	40 г/дм ³	-	-	Rakicka-Pustulka та ін., 2022
5	Модифіковані (заміщені) амінокислоти	О-ацетил-гомосерин	<i>Escherichia coli</i> W3110	7,01 г/л	40 г/л	-	-	Liu, Liu, Zhang, Liu, & Zheng, 2020
6	Антимікробні секвітерпени	β-фарнезен	<i>Escherichia coli</i> F4	10,31 г/л	22,2 г/л	-	-	Yao, You, Qi, Su, & He, 2020
7	Фітогормони	Індол-3-оцтова кислота	<i>Rhodospiridiobolus flavialis</i> DMKU-CP293	3569,32 мг/л	45 г/л	-	-	Bunsangiam, Thongpae, & Limtong, 2021

Отже, інформації щодо мікробного синтезу на основі відходів виробництва біодизелю на сьогодні налічується чимало, і представлені вище статті є лише частиною досліджень на дану тематику, які на сьогодні також активно продовжуються з величезними перспективами у майбутньому.

Таким чином, відходи виробництва біодизелю можуть бути ефективно використані у біотехнології для отримання різноманітних мікробних продуктів. Наукові дослідження демонструють, що ці відходи можуть слугувати джерелом для вирощування багатьох видів мікроорганізмів, як дріжджових, так і бактеріальних клітин, які виробляють практично цінні продукти, такі як спирти, поліолі, ліпіди, каротиноїди, органічні кислоти, ферменти, поверхнево-активні речовини, полісахариди, ферменти та інші хімічні сполуки (*табл.2.1.-2.8.*). Крім того, ефективність використання відходів біодизелю підкреслена оптимізацією процесів їх обробки та культивування, таких як мікрофільтрація, переестерифікація, ультразвукова обробка, стерилізація тощо для очистки та підготовки відходів, використання мікробних консорціумів, ко-субстратів (поєднання відходів біодизельної промисловості з іншою вторинною сировиною) для ефективного синтезу біопродуктів, до того ж застосування генетичних модифікацій та математичних методів теж мають не менш багато обіцяючі перспективи.

Загалом, використання відходів виробництва біодизелю у біотехнологічних процесах відкриває нові варіанти та можливості для відновлення ресурсів та зменшення негативного впливу на довкілля, утилізуючи промислові відходи. Оптимізація процесів на відходах виробництва біодизелю не лише сприяє створенню стійких біотехнологічних систем, але й пропонує економічно ефективні та сталі замітники для традиційної сировини.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Об'єкти досліджень

Із зареєстрованих у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ було обрано нафтоокислювальний штам бактерій, ізольований зі зразка ґрунту під номером ІМВ В-7241 та ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 (Pirog, Shevchuk, Voloshina, Gregirchak, 2005).

Для регулювання біологічних властивостей поверхнево-активних речовин (ПАР), синтезованих штамом *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, використовували гра-мнегативні бактерії *Enterobacter cloacae* С-8 як біологічний індуктор. З метою оцінки біологічної активності ПАР, зокрема їх антимікробних та антиадгезивних властивостей, а також здатності руйнувати біоплівки, було залучено різноманітні тест-культури. Серед них бактеріальні штами: *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Enterobacter cloacae* С-8, *Proteus vulgaris* ПА-12, а також дріжджові культури: *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2, які належать до колекції живих культур Кафедри біотехнології та мікробіології Національного університету харчових технологій.

3.2. Умови культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241

Штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 вирощували у рідкому мінеральному середовищі зазначеного 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;

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Благодир Д. О.			Розділ 3. Матеріали і методи досліджень	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							60	125
Керівник		Пирог Т. П.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В. П.						

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1;
- дріжджовий автолізат – 0,5% (об'ємна частка);
- розчин мікроелементів – 0,1% (об'ємна частка), що включав такі компоненти (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; Трилон Б – 0,5;
- вода дистильована – до 1 л.

Як джерело вуглецю та енергії в середовище додавали (% об'ємна частка): очищений гліцерин – 3, відходи виробництва біодизелю – 5, підтримуючи еквімолярність за вмістом вуглецю для гліцерину різного ступеня очищення. рН підтримували в межах 6,8–7,0.

Посівний матеріал штаму ІМВ В-7241, отриманий на експоненційній фазі росту, культивували в середовищі наведеного складу з додаванням 0,5% обраного субстрату. Кількість інокуляту становила 10% від загального об'єму середовища, з концентрацією бактеріальних клітин на рівні 10^4 – 10^5 кл/мл.

3.3. Підготовка біологічного індуктора *Enterobacter cloacae* С-8

Для введення конкурентних грамнегативних бактерій (біологічного індуктора) *E. cloacae* С-8 у середовище культивування продуцента ПАР, до початку процесу додавали суспензію цих бактерій, представлених живими та інактивованими клітинами, а також відповідним супернатантом.

У експерименті використовували два варіанти підготовки біологічного індуктора 9 конкурентних мікроорганізмів.

- Варіант 1. Бактерії *E. cloacae* С-8, вирощені протягом 24 годин на м'ясо-пептонному агарі (МПА), суспендували у 100 мл стерильної води. На кожні 100 мл живильного середовища для продуцента ПАР додавали по 2,5 мл суспензії. Інактивовані клітини готували автоклавуванням при 131 °С протягом 1 години, після чого додавали 10 мл цієї суспензії на 100 мл середовища. Стерилізований у автоклаві супернатант (112 °С, 30 хвилин) вносили по 2,5 мл на 100 мл середовища для культивування штаму *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

- Варіант 2. Бактерії *E. cloacae* C-8 культивували в аналогічному середовищі, призначеному для продуцента ПАР, протягом 24 годин на качалці, але з використанням глюкози як джерела вуглецю (0,5% масової частки).

Культивування штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7241 з додаванням супернатанту, живих та інактивованих клітин біологічного індуктора *E. cloacae* C-8, а також без внесення конкурентних мікроорганізмів проводили у колбах об'ємом 750 мл, заповнених 100 мл живильного середовища. Умови культивування: швидкість 320 об/хв, температура 30 °С, тривалість 7 діб.

Експерименти склалися з декількох етапів: оцінка концентрації ПАР як цільового продукту, визначення їх антимікробних та антиадгезивних властивостей, а також оцінка ступеня руйнування одно- та двовидових бактеріальних і дріжджових біоплівки.

3.4. Виділення і визначення концентрації поверхнево-активних речовин

Масу позаклітинних поверхнево-активних речовин (г/л), синтезованих бактеріями, визначали гравіметричним методом після екстракції із супернатанту культуральної рідини за допомогою модифікованої суміші Фолча (хлороформ–метанол у пропорції 2:1), адаптованої згідно з методикою Блая-Даєра (Gomes, Nitschke, 2012). Оскільки штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 продукує як полярні, так і неполярні ліпіди, стандартний підхід Блая-Даєра (Bligh, Dyer, 1959) модифікували для підвищення ефективності вилучення полярних ліпідів, додавши до суміші 1 М розчин HCl (співвідношення хлороформ–метанол–вода = 4:3:2). Така методика, описана в дослідженні (Пирог, Іванов, Ярова, 2021), забезпечує повніше виділення обох типів ліпідів.

На початковому етапі культуральну рідину піддавали центрифугуванню при 5000 g протягом 20 хвилин для відділення біомаси. Після цього 25 мл супернатанту переносили в ділительну воронку об'ємом 100 мл, додаючи приблизно 5 мл розчину 1 М HCl, щоб довести рН до 4,0–4,5. Суміш у воронці закривали корком і струшували протягом 5 хвилин, щоб провести екстракцію ліпідів. Після цього фазам давали відокремитися, нижню органічну фазу збирали як органічний екстракт 1, а водну фазу повторно піддавали екстрагуванню. Для другого етапу екстракції до водної фази

знову додавали 5 мл 1 М HCl та 15 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) і струшували протягом 5 хвилин. Після розподілу фаз знову збирали нижній органічний екстракт 2. На третьому етапі до залишкової водної фази додавали 25 мл тієї ж суміші розчинників і повторювали процедуру, отримуючи органічний екстракт 3. Усі органічні екстракти (1–3) об'єднували та випарювали на роторному випарнику IP-1M2 при температурі 50 °C і тиску 0,4 атм до постійної маси (Пирог, Іванов, Ярова, 2021).

Для досліджень готували розчини ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у концентраціях від 5 до 640 мкг/мл. Сухий залишок ПАР розчиняли в 25 мл стерильного фосфатного буфера (0,1 М, рН 7,0), потім здійснювали послідовні розведення до необхідної концентрації. Отримані розчини стерилізували автоклавуванням при 112 °C протягом 30 хвилин (Пирог, Іванов, Ярова, 2021).

3.5. Дослідження антимікробної активності поверхнево-активних речовин

Оцінку антимікробної активності поверхнево-активних речовин (ПАР) здійснювали, визначаючи мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) згідно з методикою (Chebbi, 2017). Для цього застосовували метод серійних двократних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій та у рідкому суслі для дріжджових культур.

Підготовка розведень ПАР проводилась у стерильних умовах. До 10 стерильних пробірок спочатку вносили по 1 мл відповідного живильного середовища. У першу пробірку (№1) додавали 1 мл розчину ПАР заданої концентрації, обережно перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку (№2). За аналогічним принципом виконували розведення в кожній наступній пробірці, як висновок, знижуючи концентрацію ПАР у 2 рази. Таким чином, кінцевий об'єм у кожній пробірці складав 1 мл (МПБ чи рідке сусло + розчин ПАР). Для контрольної проби використовували 1 мл МПБ (для бактерій) або рідке сусло (для дріжджів) без додавання розчину ПАР. Далі у кожну з пробірок (дотримуючись умов стерильності) вносили по 0,1 мл суспензії відповідних тест-культур (чисельності 10^5 - 10^6 КУО/мл) та обережно перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28–30 °C (для бактеріальних тест-культур) та 24–26 °C (для дріжджових тест-культур).

Оцінка результатів базувалася на візуальному спостереженні: наявність або відсутність помутніння середовища. Якщо помутніння з'являлося, це відзначали як (+), що вказувало на ріст культури. За відсутності помутніння ставили позначку (–), що означало відсутність росту культури. Мінімальну інгібуючу концентрацію ПАР визначали як найменшу концентрацію в останній пробірці, де спостерігалася повна відсутність росту культури.

3.6. Визначення антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин

Метод оцінки антиадгезивної дії поверхнево-активних речовин був розроблений за прикладом методики, описаної в дослідженні (Rufino, 2011).

Попередньо очищені з використанням мийного засобу та висушені пластинки твердих матеріалів розміром 1 см² піддавали стерилізації відповідно до їх властивостей: кахельні й сталеві пластинки стерилізували при температурі 121 °С протягом 30 хвилин, а лінолеум — при 112 °С, також протягом 30 хвилин. Далі зразки обробляли розчином ПАР у концентраціях від 8 до 64 мкг/мл; для контрольної групи використовували стерильний фосфатний буфер. Інкубація пластинок тривала 18-24 години при 30 °С. Потім оброблені та контрольні зразки промивали стерильним фосфатним буфером або дистильованою водою для видалення залишків реагентів.

Для експерименту використовували ододобові культури бактерій і дріжджів, вирощені на МПА або сусло-агарі відповідно, які суспендовані в 100 мл стерильної водопровідної води. У суспензію поміщали підготовлені зразки, витримуючи їх при 30 °С протягом двох годин. Далі пластинки промивали стерильною водою для видалення клітин, які не прилипли до поверхні.

Зразки з адгезованими клітинами висушували за кімнатної температури, обробляли метанолом (99 %) протягом 15 хвилин (під витяжною шафою) для закріплення клітин, після чого знову залишали для висихання. Пластинки занурювали в розчин генціанвіолету (1 %) на 5 хвилин, промивали водопровідною водою і залишали сушитися при кімнатній температурі. Після повного висихання зразків обробляли поверхню 1 мл льодової оцтової кислоти, і отриману суспензію вимірювали на спектрофотометрі при 540 нм для визначення оптичної щільності.

Відсоток клітин, що адгезувалися, розраховували, як співвідношення оптичних густин суспензій зразків оброблених та контрольних зразків.

3.7. Дослідження ступеня руйнування одновидових біоплівки за дії поверхнево-активних речовин

Для аналізу ступеня руйнування біоплівки був обраний і застосований метод, описаний у дослідженні (Gomes & Nitschke, 2012). У полістиролові мікропланшети для утворення бактеріальних або дріжджових біоплівки додавали 180 мкл поживного середовища (МПБ або рідке сусло) та 20 мкл суспензії однодобової культури відповідного тест-організму. Культивування тривало 24 години за оптимальної температури для досліджуваних культур.

Після завершення першого етапу інкубації культуральну рідину переносили у кристалізатор, а до лунок повторно додавали свіжі 180 мкл поживного середовища (МПБ чи сусло) разом із 20 мкл суспензії культури, яку знову інкубували ще 24 години. Дводобове (48 годин) культивування забезпечувало необхідне формування біоплівки на полістиролових мікропланшетах.

По завершенню інкубації культуральну рідину зливали, і в лунки з утвореною бактеріальною або дріжджовою біоплівкою додавали по 200 мкл розчинів із ПАР у діапазоні концентрацій від 5 до 640 мкг/мл. У контрольні лунки вносили по 200 мкл стерильної водопровідної води без додавання ПАР. Після 24-годинної дії розчинів лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води, а кількість прикріплених клітин визначали спектрофотометрично, як це проводилося при оцінці антиадгезивних характеристик.

Відсотковий рівень деструкції біоплівки розраховували на основі різниці в числі клітин, що прикріпилися у контрольних та оброблених ПАР лунках мікропланшета.

3.8. Дослідження ступеня руйнування двовидових бактеріальних біоплівки під впливом суміші поверхнево-активних речовин з ефірною олією

Експеримент для вивчення ступеня руйнування двовидових бактеріальних біоплівки був виконаний за методикою, поданою в роботах (Zacchino, 2017; Jeong, 2024), із внесенням низки адаптацій.

Для створення біоплівки в лунки полістиролових мікропланшетів додавали 180 мкл живильного середовища МПБ та 20 мкл суспензії, яка містила однодобові культури бактерій. Таку композицію інкубували при температурі, що є оптимальною для двох видів бактерій, протягом 24 годин.

Після цього культуральну рідину переносили у кристалізатор, знову додавали до мікропланшетів 180 мкл свіжого середовища МПБ і 20 мкл суспензії бактеріальних культур, і знову інкубували протягом наступних 24 годин. Подвійне інкубування загальною тривалістю 48 годин забезпечувало формування двовидової біоплівки на мікропланшетах.

Через 48 годин культуральну рідину зливали, а в лунки, на поверхні яких уже утворилася біоплівка з двох бактеріальних видів, додавали по 200 мкл розчинів поверхнево-активних речовин, ефірної олії чайного дерева (виробництва «Ароматика», без додаткової обробки), а також їх сумішей у концентраціях від 5 до 640 мкг/мл. У контрольні лунки додавали по 200 мкл стерильної водопровідної води. Після 24 годин витримки лунки три рази промивали по 200 мкл дистильованої води, а кількість клітин, що залишилися на поверхні, визначали спектрофотометричним методом, аналогічним тому, що використовувався для оцінки антиадгезивних властивостей.

Ступінь деструкції двовидової бактеріальної біоплівки обчислювали у відсотках, порівнюючи адгезію клітин у контрольних і оброблених ПАР, ефірною олією та їх сумішшю зразках мікропланшетів.

3.9. Дослідження ступеня руйнування двовидових бактеріально-дріжджових біоплівок за дії суміші поверхнево-активних речовин з ефірною олією

Для оцінки ступеня руйнування бактеріально-дріжджових біоплівок, утворених двома видами мікроорганізмів, був використаний метод, адаптований на основі робіт (Liu, 2019; de Alteriis, 2018) з додатковими модифікаціями.

Для утворення біоплівки на полістиролових мікропланшетах додавали 180 мкл живильного середовища (по 90 мкл рідкого сусла та МПБ) і 20 мкл суміші, що містить добові бактеріальні та дріжджові культури. Культивування тривало 24 години за оптимальної температури для досліджуваних культур.

Після завершення першого етапу культуральну рідину зливали, а потім знову вносили у лунки свіжу суміш із 180 мкл живильних середовищ та 20 мкл суспензії культур для подальшого 24-годинного інкубування. Дводобове інкубування (48 годин загалом) забезпечувало формування повноцінної біоплівки на мікропланшетах.

Після цього культуральну рідину зливали, а в лунки з утвореною біоплівкою додавали по 200 мкл розчинів із поверхнево-активними речовинами, ефірною олією чайного дерева (використовувалася продукція від «Ароматика», без додаткової обробки), а також їхніми сумішами в різних концентраціях (5–640 мкг/мл). Для контролю в інші лунки вносили 200 мкл стерильної води без додавання препаратів. Після 24 годин витримки лунки три рази промивали по 200 мкл дистильованої води, після чого за допомогою спектрофотометричного аналізу визначали кількість клітин, що залишилися.

Ступінь деструкції двовидової бактеріально-дріжджової біоплівки обчислювали у відсотках, порівнюючи адгезію клітин у контрольних і оброблених ПАР, ефірною олією та їх сумішшю зразках мікропланшетів.

3.10. Статистична обробка даних

Дослідження, детально описані вище, були проведені в трьох повтореннях, причому кожен експеримент складався з 3–5 паралельних вимірювань. Статистичний аналіз даних проводився за методикою, описаною раніше (Пирог, Іванов, Ярова, 2021). Відмінності між середніми результатами вважались значущими, якщо ймовірність випадкового отримання таких або більших відмінностей менш як 5%.

РОЗДІЛ 4

БАКТЕРІЇ РОДУ *ENTEROBACTER* ЯК ФАКТОР РЕГУЛЯЦІЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241

Відомо, що поверхнево-активні речовини володіють рядом біологічних властивостей, такими як антимікробна та антиадгезивна активності, включно із здатністю до руйнування біоплівки, які є головними критеріями оцінки їх ефективності.

4.1. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності біологічних індукторів

Так, у *табл. 4.1* наведено мінімальні інгібуючі концентрації поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованих у середовищі з конкурентними грамнегативними бактеріями *Enterobacter cloacae* C-8. Результати досліджень показали, що культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у середовищі з відходами виробництва біодизелю за внесення живих клітин біологічного індуктора, отриманих на рідкому середовищі з глюкозою, супроводжувалось синтезом ПАР з підвищеною антимікробною активністю щодо бактеріальних тест-культур, порівняно з МІК ПАР, утворених без цього індуктора. Так, мінімальні інгібуючі концентрації таких ПАР (11,8–23,7 мкг/мл) були у 1,5–16,7 разів нижчими, порівняно з МІК ПАР, утворених на середовищі без цього індуктора (17,5–197,5 мкг/мл) (див. *табл. 4.1*). Схожі показники прослідковуються і у випадку використання ПАР, отриманих на відходах виробництва біодизелю за додавання супернатанту індуктора, МІК ПАР яких були нижчими у 4,5-18,1 разів, порівняно з показниками ПАР, утворених без *E. cloacae* C-8. У той же час інактивовані клітини виявилися менш ефективним індуктором, порівняно з живими клітинами та супернатантом, і були лише на 2,3-4,6 разів нижчими від МІК ПАР, отриманих без додавання штаму C-8.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Благодир Д. О.				Розділ 4. Бактерії роду <i>Enterobacter</i> як фактор регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							68	125
Керівник	Пирог Т. П.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В. П.							

У випадку вирощування індуктора на МПА (див. *табл. 4.1*) та внесення його у різному фізіологічному стані у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з очищеним гліцерином було отримано ПАР, антимікробна активність яких була значно нижчою (56,2-85 мкг/мл) щодо усіх бактеріальних тест-культур порівняно з використанням *E. cloacae* С-8, одержаних на рідкому середовищі з глюкозою, окрім МІК щодо *S. aureus* БМС-1 (28,1 мкг/мл) встановлених за обробки ПАР, отриманих за внесення живих клітин індуктора, культивованих на агаризованому середовищі.

Разом з тим дані, наведені у *табл. 4.1*, засвідчують, що антимікробна активність ПАР, синтезованих за наявності живих клітин *E. cloacae* С-8, одержаних на рідкому середовищі з глюкозою, при культивування на відходах виробництва біодизелю, була вищою, ніж поверхнево-активних речовин, одержаних на очищеному гліцерині (МІК щодо досліджуваних тест-культур становили 11,8-23,7 і 10-56,2 мкг/мл відповідно).

Таблиця 4.1

Антимікробна активність ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різної якості за наявності *E. cloacae* С-8 щодо бактерій

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо			
			<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		280	140	140	280
	Живі клітини	МПА	56,2	56,2	28,1	56,2
	Інактивовані клітини		85	85	85	85
	Супернатант		120	120	60	120
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	40	40	20	10
	Інактивовані клітини		45	80	24,2	24,2
	Супернатант		82,5	41,2	41,2	41,2
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		197,5	98,7	17,5	197,5
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	23,7	11,8	11,8	23,7
	Інактивовані клітини		42,5	85	43,7	85
	Супернатант		21,8	21,8	10,9	43,7

У той же час внесення супернатанту після вирощування *E. cloacae* С-8 у середовище з відходами виробництва біодизелю супроводжувалося утворенням ПАР з вищою антимікробною активністю порівняно з препаратами, синтезованими на середовищі очищеним гліцерином (10,9–21,8 і 10,3–120 мкг/мл відповідно, див. табл. 4.1). Крім того, ефективність поверхнево-активних речовин, отриманих за внесення інактивованих клітин індуктора, отриманих на рідкому середовищі з глюкозою, доданих у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з очищеним гліцерином, була значно вищою щодо тест-культур *Staphylococcus aureus* БМС-1 та *Pseudomonas* sp. МІ-2, ніж у разі культивування продуцента на відходах виробництва біодизелю (24,2 та 43,7-85 мкг/мл відповідно), тоді як для *Bacillus subtilis* БТ-2 та *Escherichia coli* ІЕМ-1 показники МІК ПАР були практично однакові (45-80 та 42,5-85 мкг/мл відповідно). Проте синтезовані за їх наявності ПАР характеризувалися дещо нижчою антимікробною активністю щодо бактеріальних тест-культур порівняно з препаратами, утвореними за використання живих клітин С-8 (див. табл. 4.1).

Таблиця 4.2

Вплив ПАР, отриманих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різної якості за наявності *E. cloacae* С-8, на антимікробну активність щодо дріжджів

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо	
			<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		280	140
	Живі клітини	МПА	28,1	14
	Інактивовані клітини		10,6	21,2
	Супернатант		120	60
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	10	5
	Інактивовані клітини		45	20,6
	Супернатант		10,3	5,6
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		197,5	98,7
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	11,8	5,9
	Інактивовані клітини		42,5	42,5
	Супернатант		21,8	21,8

Результати щодо дослідження впливу ПАР, синтезованих за наявності *E. cloacae* С-8, на дріжджі роду *Candida* зазначено у табл. 4.2. Отримані дані свідчать про те, що використання живих клітин конкурентних грамнегативних бактерій *E. cloacae* С-8, отриманих на рідкому середовищі з глюкозою, супроводжувалося синтезом ПАР, отриманих на гліцерині різної якості, з найвищою антифунгальною активністю (МІК 5,9–11,8 мкг/мл). Так, мінімальні інгібуючі концентрації таких ПАР щодо дріжджових тест-культур були у 16,7–28 разів нижчими, порівняно з МІК ПАР, утворених на середовищі без цього індуктора (98,7–280 мкг/мл) (див. табл. 4.1). Аналогічна ефективність ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, спостерігалася за використання супернатанту після вирощування *E. cloacae* С-8 за умов культивування на рідкому середовищі з глюкозою (МІК 5,6–10,3 мкг/мл). ПАР, отримані на гліцерині різної якості, синтезовані за внесення інактивованих клітин штаму С-8, незалежно від середовища культивування (агаризоване чи рідке), виявилися менш ефективними, порівняно з живими клітинами та супернатантом, і були лише у 2,3-4,6 разів нижчими від МІК ПАР, отриманих без додавання штаму С-8. Проте МІК ПАР, отриманих при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині за внесення інактивованих клітин індуктора, отриманих на рідкому середовищі з глюкозою, щодо *S. tropicalis* РЕ-2 мали аналогічну ефективність, що й поверхнево-активні речовини у випадку внесення супернатанту після вирощування *E. cloacae* С-8.

У випадку вирощування індуктора на МПА (див. табл. 4.2) та внесення його у вигляді живих та інактивованих клітин у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з очищеним гліцерином було отримано ПАР, антимікробна активність яких була дещо нижчою, проте не менш ефективною (10,6-28,1 мкг/мл) щодо дріжджових тест-культур, порівняно з МІК ПАР, синтезованих за наявності живих та інактивованих клітин *E. cloacae* С-8, одержаних на рідкому середовищі з глюкозою. Однак ПАР, отримані за внесення супернатанту індуктора, вирощеного на МПА, характеризувалися значно нижчою антимікробною активністю (60-120 мкг/мл), у порівнянні з ПАР, одержаними за наявності супернатанту *E. cloacae* С-8, отриманому на рідкому середовищі (5,6-21,8 мкг/мл).

Такі результати є відмінними від описаних у літературі щодо додавання біологічних індукторів у різному фізіологічному стані у середовище культивування продуцентів. Так у роботі (Liang, 2020), МІК N-карбамоїл-2-гідрокси-3-метоксибензаміду та карбазохіноцину G, отриманих шляхом спільного культивування продуцента *Streptomyces* sp. RKND-216 з інактивованими, шляхом теплової обробки, біологічними індукторами *Alteromonas* sp. RKMC-009 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 120515 не виявляли позитивної антимікробної та антифунгальної активності щодо метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкомицин-резистентного *Enterococcus faecium* (VRE), *S. warneri*, *Proteus vulgaris* та *C. albicans*. Аналогічні результати були відмічені у праці (Liang, 2019), де гідразидоміцин D, отриманий у результаті спільного культивування *Streptomyces* sp. RKBH-B178 із інактивованими клітинами індуктора *Mycobacterium smegmatis*, не виявляв антимікробної активності щодо індуктора *M. smegmatis*.

У іншому дослідженні (Akone, 2016) показано, що суміш метилових ефірів 3- та 4-гідроксибензойної кислоти та полікетидів акремонізолу A, отримана спільним культивуванням ендофіта гриба *Chaetomium* sp. з, інактивованим автоклавуванням індуктором *B. subtilis*, проявляла слабку антимікробну дію щодо *B. subtilis* – МІК становили 53 мкМ, у той же час МІК щодо *S. aureus* ATCC 25923 та *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 були вище 100 мкМ.

Schneider зі співавт. (Schneider, 2020) у своєму дослідженні не відзначали антимікробної активності, синтезованих серратіохелінів A і C у разі спільного культивування *Shewanella* sp. і *Serratia* sp., проти *S. agalactiae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis* і MRSA.

Автори статті (Bao, Wang, Zhang, Nong, & Qi, 2017) також не зазначають позитивної антимікробної дії метаболіту склероціоруміну C, отриманого шляхом спільного культивування *Aspergillus sclerotiorum* із живими клітинами індуктора *Penicillium citrinum*, щодо *S. aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* і *Bacillus stearothermophilus*.

Sung зі співавт. (Sung, Gromek, & Balunas, 2017) дослідили МІК трьох антибіотиків: гранатицину, гранатоміцину D та дигідрогранатицину B, отриманих

Streptomyces sp. PTY087I2 за спільного культивування із живими клітинами *B. subtilis*, мецитилін-резистентного *S. aureus* (MRSA) та *Pseudomonas aeruginosa* і визначили, що жоден з отриманих метаболітів не продемонстрував антимікробної активності проти *P. aeruginosa* (МІК>400 мкг/мл), проте вони продемонстрували однаково підвищену активність проти грампозитивних патогенів. Спільне культивування *Streptomyces* sp. PTY087I2 із MRSA призвело до найбільш значного підвищення антимікробної активності зі значеннями МІК у 8-16 разів вищими, ніж без використання індуктора проти *B. subtilis* та MRSA. Цікаво, що спільне культивування з грамнегативною бактерією *P. aeruginosa* призвело до 4-кратного підвищення ефективності проти всіх грампозитивних патогенів, окрім *P. aeruginosa*.

У роботі (Wang, 2021) науковці також досліджували багато варіацій спільного культивування продуцентів міколової кислоти з біологічними індукторами у різному фізіологічному стані і визначили, що міколова кислота отримана у результаті спільного культивування *Streptomyces* sp. FXJ1.4112 та інактивованих тепловою обробкою клітин *Mycobacterium* sp. НХ10-42 виявляла антибактеріальну активність проти *E. coli*, яка не спостерігалася у монокультурах. Подібні результати відзначали також у спільних культурах *Streptomyces* sp. FXJ1.4106 із живими клітинами МАСВ (Mycolic Acid-Containing Bacteria). Якщо розглядати міколову кислоту синтезовану монокультурою *Streptomyces* sp. FXJ1.235, то антибактеріальна активність проти *Micrococcus luteus* була низька, тоді як додавання інактивованих та живих клітин індукторів *Mycobacterium* sp. НХ10-42 і *Rhodococcus* sp. НХ10-55 відповідно посилювало антимікробну активність міколової кислоти проти *M. luteus*. Варто зауважити, що міколова кислота отримана ко-культивуванням *Streptomyces* sp. FXJ1.4094 та живих клітин *Nocardia* sp. НХ10-55 характеризувалася чіткою протигрибковою активністю проти *Trichoderma viride*, що значно відрізнялося від результатів з монокультурою.

У іншій праці (Lim, 2022) у середовище культивування продуцента *Streptomyces* sp. GET02.ST вносили живі клітини індуктора *Achromobacter* sp. GET02.AC з метою отримання утворення нових метаболітів – лігіаміцинів А і В. Так лігіаміцин А продемонстрував помірну інгібуючу дію щодо *S. aureus* та *S. enterica* (16

мкг/мл), тоді як лігіаміцин В виявив слабку антимікробну активність (МІК > 128 мкг/мл). Крім того, лінгаміцин А і В не виявили будь-яких значних антифунгальних ефектів (МІК > 128 мкг/мл) проти досліджуваних штамів дріжджів (*C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, and *T. mentagrophytes*). Автори дослідження (Jiang, 2021) також повідомляють про слабку антимікробну дію лонгікатенамідів А, отриманих методом комбінованого культивування *Streptomyces* sp. KUSC_F05 і *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596

Maglangit зі співавт. (Maglangit, Fang, Kyeremeh, Sternberg, Ebel, & Deng, 2020) вивчали спільне культивування *Streptomyces* sp. MA37 з конкурентними грамнегативними бактеріями *Pseudomonas* sp., внаслідок чого отримали алкалоїд індолоккарбазол BE-13793С, який не характеризувався значною антимікробною активністю навіть при найвищій випробуваній концентрації (140 мкМ) щодо грампозитивних (*E. faecalis*, *S. aureus*, *Streptococcus B.*, *S. haemolyticus*) та грамнегативних бактерій (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

У роботі (Hifnawy, 2020) науковці відзначили, що за рахунок спільного культивування губчасто-асоційованих актиноміцетів, *Micromonospora* sp. UR56 і *Actinokineospora* sp. EG49 було отримано основні метаболіти туберміцин і р-анісамід, які продемонстрували потужну антимікробну активність проти *P. aeruginosa* із пригніченням росту на 94% і 70% відповідно, тоді як сполуки диметилфеназин-1,6-дикарбоксилат, фенкоміцин та N-(2-гідроксифеніл)-ацетамід продемонстрували значну антимікробну активність проти *S. aureus* з пригніченням росту на 47%, 69% і 53% відповідно при МІК – 15 мкМ.

Дослідження (Abdel-Wahab, 2019) демонструє помірну антимікробну активність нових метаболітів версиколорину В, аверуфіну та діорцинолів, синтезованих за умов спільного культивування *A. versicolor* та живих клітин індуктора *B. subtilis*, проти кількох грампозитивних бактерій (*S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 35667) зі значеннями МІК від 12,5 до 50 мкМ.

Shamikh зі співавт. (Shamikh, 2020) отримали непогані результати МІК міколової кислоти при культивуванні *Micromonospora* sp. UA17 з живими клітинами конкуре-

нтних бактерій *Gordonia* sp. UA19 і *Nocardia* sp. UA 23. Так було зафіксовано найвищу антимікробну та антифунгальну активність міколової кислоти зі значенням МІК 4,2, 3,9 і 3,8 мкг/мл щодо *S. aureus* NCTC 8325, *E. faecalis* і *C. albicans* 5314, тоді як активності проти *E. coli* та *P. aeruginosa* виявлено не було. Екстракти міколової кислоти також показали низьку активність проти *Trypanosoma brucei* TC 221 (МІК>100 мкг/мл), за винятком *Nocardia* sp. UA 23 (МІК=7,2 мкг/мл). Спільне культивування у роботі (Yu, 2019) також сприяло високій антимікробній активності отриманого метаболіту. Так спільне культивування *S. rochei* MB037 із грибом *Rhinocladiella similis* 35 стимулювало синтез нових метаболітів, одними з яких виявилися борелідини J, які проявили значну антимікробну активність проти метицилін-резистентного *S. aureus* (МІК=0,195 мкг/мл).

Пеніцистероїд С, отриманий Abdel-Razek зі співавт. (Abdel-Razek, Hamed, Frese, Sewald, & Shaaban, 2018) методом ко-культивування був протестований на антимікробну дію за допомогою паперово-дискового методу, демонструючи аналогічно високу активність, як і у праці (Wang, 2021), проти грамнегативних бактерій *P. aeruginosa*, грампозитивних бактерій *S. aureus* і дріжджів *C. albicans* і *S. cerevisiae*, при цьому він виявляв низьку активність щодо грамнегативних штамів *E. coli* DSMZ 1058 і *P. agarici* DSMZ 11810 і грампозитивних *B. subtilis* DSMZ 704.

Як видно з літературних даних у більшості наукових працях не спостерігається підвищення антимікробної активності або ж вона зафіксована у помірних значеннях, робіт з високою біологічною активністю налічується у меншості. На противагу цьому наші дослідження демонструють, що введення індукторів у різному фізіологічному стані у середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 привело до отримання поверхнево-активних речовин з високою антимікробною активністю при значно менших мінімально інгібуючих концентраціях (на кілька порядків), ніж ті, що фіксуються у літературі.

Таким чином, дані представлені у табл. 4.1-4.2 свідчать про можливість підвищення антимікробної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB В-7241 внесенням у середовище з гліцерином різного ступеня очищення живих клітин конкурентних грамнегативних бактерій *E. cloacae* С-8.

4.2. Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин

Окрім антимікробної активності, поверхнево-активним речовинам штаму ІМВ В-7241 властива і антиадгезивна активність. Зважаючи на це, після дослідження антимікробної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 було проведено визначення антиадгезивної здатності ПАР, синтезованих за наявності у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення клітин біологічного індуктора *E. cloacae* С-8.

Дані, представлені у *табл. 4.3-4.8*, свідчать про те, що додаткове внесення в середовище з гліцерином різного ступеня очищення живих клітин *E. cloacae* С-8 різної підготовки супроводжувалось синтезом препаратів ПАР з підвищеною антиадгезивною активністю у концентрації 64 мкг/мл.

Так, після обробки розчинами ПАР (64 мкг/мл), синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у такому середовищі, ступінь адгезії на абіотичних матеріалах грампозитивних бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2 та *Staphylococcus aureus* БМС-1) (*табл. 4.3-4.4*) був в середньому на 10–26% нижчим, порівняно з показниками ПАР, утворених у середовищі без індуктора. У разі внесення інактивованих клітин та супернатанту індуктора різної підготовки у середовище з очищеним гліцерином спостерігали синтез ПАР, за наявності яких ступінь адгезії *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1 на кахелі та лінолеумі був в середньому на 2-17% та 6-24% нижчим відповідно, ніж за дії препаратів ПАР, одержаних у середовищі без *E. cloacae* С-8, причому найнижчий рівень адгезії (47%) встановлений на лінолеумі для обох тест-культур. Подібні закономірності спостерігалися також під час дослідження адгезії *B. subtilis* БТ-2 на пластинках сталі (*табл. 4.3*) після обробки розчинами ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині за наявності інактивованих клітин та супернатанту *E. cloacae* С-8 різної підготовки. Ступінь адгезії даної тест-культури за обробки пластинок сталі такими поверхнево-активними речовинами у високій концентрації (64 мкг/мл) був в середньому на 6-11% нижче, ніж за дії препаратів ПАР, одержаних у середовищі без індукторів. У той же час антиадгезивна активність ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині за наявності супернатанту *E. cloacae* С-8, отриманого з

МПА, щодо *S. aureus* БМС-1 (табл. 4.4) за обробки ними пластинок сталі була вищою лише на 6 % від показників ПАР, одержаних без внесення біологічного індуктора.

Таблиця 4.3

Вплив ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих у середовищі за наявності індуктора, на прикріплення *B. subtilis* БТ-2 до різних поверхонь

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Адгезія, % за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)											
			Сталь				Кахель				Лінолеум			
			64	32	16	8	64	32	16	8	64	32	16	8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		61	70	72	74	59	72	74	85	64	77	80	85
	Живі клітини	МПА	43	55	65	73	43	55	72	78	40	59	63	70
	Інактивовані клітини		55	62	72	80	49	52	60	81	47	59	69	82
	Супернатант		55	66	66	74	57	69	72	78	54	62	68	77
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	37	49	62	73	42	45	55	70	42	53	77	75
	Інактивовані клітини		50	52	74	88	49	57	74	90	50	60	75	88
	Супернатант		50	60	73	81	49	69	77	80	50	71	72	85
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		65	69	80	85	62	73	71	88	64	79	81	89
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	45	47	76	81	50	56	68	76	50	61	66	83
	Інактивовані клітини		55	61	68	77	54	67	67	79	61	73	77	88
	Супернатант		55	68	84	84	55	66	79	81	59	75	75	88

Схожі результати спостерігалися також під час дослідження адгезії *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1 на пластинках сталі (табл. 4.3-4.4) після обробки розчинами ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю за наявності інактивованих клітин та супернатанту *E. cloacae* С-8. Ступінь адгезії досліджуваних тест-культур за обробки поверхонь такими поверхнево-активними речовинами у високій концентрації (64 мкг/мл) був в середньому на 10% нижчий, ніж за дії препаратів ПАР, одержаних у середовищі без індукторів.

Вплив ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, отриманих за наявності індуктора, на адгезію *Staphylococcus aureus* БМС-1 до різних поверхонь

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Адгезія, % за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)											
			Сталь				Кахель				Лінолеум			
			64	32	16	8	64	32	16	8	64	32	16	8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		59	74	92	92	74	81	79	92	61	73	70	80
	Живі клітини	МПА	45	67	80	87	50	75	78	89	51	66	75	89
	Інактивовані клітини		75	80	85	92	62	70	75	88	50	70	80	92
	Супернатант		53	62	88	94	50	55	95	94	47	59	71	94
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	45	60	75	88	55	68	80	91	35	65	70	88
	Інактивовані клітини		75	85	-	-	68	86	-	-	71	91	-	-
	Супернатант		59	69	71	79	55	71	82	95	71	75	82	94
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		59	75	82	88	61	77	92	92	66	73	85	92
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	47	60	91	86	51	70	82	82	44	65	75	94
	Інактивовані клітини		62	88	-	-	55	75	-	-	53	70	-	-
	Супернатант		55	75	88	94	55	82	86	94	59	71	88	94

Після обробки розчинами ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різної якості за внесення живих клітин індуктора *E. cloacae* С-8, отриманих за різної підготовки (табл. 4.5-4.6), адгезія грамнегативних бактерій (*Proteus vulgaris* ПА-12, *Enterobacter cloacae* С-8) на абіотичних поверхнях була в середньому на 1–21% нижчою, порівняно з показниками ПАР, утворених у середовищі без індуктора. Схожі результати було зафіксовано у випадку внесення супернатанту індуктора різної підготовки у середовище з очищеним гліцерином, так ступінь адгезії грамнегативних бактерій на кахелі, сталі та лінолеумі був в середньому на 1-16% нижчим, ніж за дії препаратів ПАР, одержаних у середовищі без *E. cloacae* С-8. Зауважимо, що

найнижчий рівень адгезії (39-41%) встановлений на пластинках сталі та кахлю для тест-культури *E. cloacae* С-8 за високої концентрації ПАР (64 мкг/мл).

Таблиця 4.5

Антиадгезивна активність ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності індуктора, щодо *Proteus vulgaris* ПА-12

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Адгезія, % за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)											
			Сталь				Кахель				Лінолеум			
			64	32	16	8	64	32	16	8	64	32	16	8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		55	63	73	93	56	63	66	95	58	68	86	94
	Живі клітини	МПА	37	47	72	90	55	64	75	88	45	73	81	90
	Інактивовані клітини		51	58	66	90	68	77	92	94	52	69	89	88
	Супернатант		52	62	77	95	55	67	90	89	51	55	59	89
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	38	66	84	96	48	63	61	74	50	70	71	84
	Інактивовані клітини		63	72	79	92	62	74	92	92	51	54	67	90
	Супернатант		47	67	77	88	45	70	79	85	42	55	66	88
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		61	58	73	88	51	63	84	94	55	64	92	95
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	40	57	92	95	44	64	75	89	50	73	91	95
	Інактивовані клітини		50	60	75	90	43	55	80	90	60	75	88	90
	Супернатант		45	60	67	87	48	50	64	95	58	60	89	98

У той же час після обробки пластинок лінолеуму ПАР, синтезованими за внесення інактивованих клітин та супернатанту індуктора, отриманих за різної підготовки, у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з очищеним гліцеринном, ступінь адгезії *P. vulgaris* ПА-12 та *E. cloacae* С-8 був нижчим на 6-16 % та 4-17 %, у порівнянні з ПАР, одержаних без індуктора.

Крім того, під час дослідження адгезії грамнегативних тест-культур на пластинках сталі та кахлю після обробки розчинами ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ

В-7241 за наявності інактивованих клітин та супернатанту *E. cloacae* С-8 на відходах виробництва біодизелю антиадгезивна активність була вищою на 3-16%, ніж ПАР отриманих без індуктора. Причому найнижчий рівень адгезії (43-44%) встановлений на пластинках кахлю для обох тест-культур за високої концентрації ПАР (64 мкг/мл) (табл. 4.5-4.6).

Таблиця 4.6

Вплив ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності конкурентних грамнегативних бактерій, на адгезію *Enterobacter cloacae* С-8

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Адгезія, % за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)											
			Сталь				Кахель				Лінолеум			
			64	32	16	8	64	32	16	8	64	32	16	8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		50	71	73	75	51	73	76	88	57	76	82	87
	Живі клітини	МПА	33	50	67	74	43	65	73	80	41	53	77	89
	Інактивовані клітини		54	53	73	82	46	55	61	83	40	60	70	84
	Супернатант		41	58	67	77	39	55	69	77	43	55	69	75
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	30	45	64	76	32	54	64	81	41	61	79	77
	Інактивовані клітини		45	53	75	85	45	58	75	82	53	61	69	84
	Супернатант		40	55	72	82	39	61	69	82	51	68	74	87
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		59	50	81	92	50	55	65	92	52	57	66	94
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	38	46	74	79	40	44	65	75	42	60	65	80
	Інактивовані клітини		50	59	67	78	44	64	66	78	51	71	75	85
	Супернатант		50	66	85	82	55	67	77	80	62	72	74	85

Зниження адгезії дріжджових тест-культур (*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2) (табл. 4.7-4.8) також спостерігали після обробки розчинами ПАР (64 мкг/мл), синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біоди-

зелю за внесення живих клітин індуктора, отриманих на рідкому середовищі з глюкозою. Так ступінь адгезії на абіотичних матеріалах дріжджів був в середньому на 20–42% нижчим, порівняно з показниками за наявності ПАР, утворених у середовищі без індуктора. У разі внесення інактивованих клітин та супернатанту індуктора у середовище з відходами виробництва біодизелю спостерігали синтез ПАР, за наявності яких ступінь адгезії *C. albicans* Д-6 та *C. tropicalis* PE-2 на кахелі, сталі та лінолеумі був в середньому на 15-35% та 3-21% нижчим відповідно, ніж за дії препаратів ПАР, одержаних у середовищі без *E. cloacae* С-8, причому найнижчий рівень адгезії (36-40%) встановлений на пластинках кахлю та лінолеуму для *C. albicans* Д-6 лише за високих концентрацій ПАР (64 мкг/мл).

Подібні закономірності спостерігалися також під час дослідження адгезії дріжджових тест-культур на усіх пластинках (табл. 4.7-4.8) після обробки розчинами ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності живих та інактивованих клітин, отриманих на обох субстратах, *E. cloacae* С-8 на очищеному гліцерині. Ступінь адгезії дріжджів роду *Candida* за обробки поверхонь такими поверхнево-активними речовинами у високій концентрації (64 мкг/мл) був в середньому на 6-28% нижче, ніж за дії препаратів ПАР, одержаних у середовищі без індукторів. Антиадгезивна активність ПАР щодо дріжджів, одержаних за наявності супернатанту індуктора, отриманого на обох субстратах, у середовищі з очищеним гліцерином була нижчою ніж у випадку використання живих та інактивованих клітин і становила 48-52%, порівняно з обробкою препаратами, синтезованими без індуктора (60-71%).

Отримані дані показують, що ефективність антиадгезивної дії ПАР залежить від різних факторів, таких як концентрація ПАР, тип абіотичної поверхні та вид тестової культури. Крім того, не встановлено прямої взаємозв'язку між антимікробною та антиадгезивною активністю ПАР, які були синтезовані за різних умов культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Це свідчить про те, що антиадгезивна дія мікробних поверхнево-активних речовин базується не лише на антимікробній активності, а й на інших механізмах, таких як зміна поверхневого заряду клітин або поверхні.

Антиадгезивна активність ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, отриманих за наявності конкурентних грамнегативних бактерій, щодо *Candida albicans* Д-6

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Адгезія, % за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)											
			Сталь				Кахель				Лінолеум			
			64	32	16	8	64	32	16	8	64	32	16	8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		58	75	83	92	64	79	79	93	62	68	75	90
	Живі клітини	МПА	42	50	67	67	43	64	75	94	48	70	80	86
	Інактивовані клітини		42	70	80	87	36	64	75	91	45	55	80	91
	Супернатант		55	60	75	94	58	64	86	95	60	70	90	92
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	43	67	81	83	51	71	80	87	45	63	75	83
	Інактивовані клітини		42	52	78	93	57	66	83	88	50	75	80	95
	Супернатант		52	62	80	87	58	70	77	89	52	65	75	95
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		67	77	83	92	71	74	79	93	65	69	75	90
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	40	58	73	85	29	66	70	86	40	60	85	90
	Інактивовані клітини		50	63	72	86	36	64	76	86	40	60	80	91
	Супернатант		52	63	82	90	48	66	80	89	50	70	80	92

Для порівняння антиадгезивної активності наших ПАР з іншими мікробними поверхнево-активними речовинами, синтезованими на гліцерині, були проаналізовані відповідні літературні дані щодо їх антиадгезивних властивостей. Зазначимо, що праць, у яких описана антиадгезивна активність ПАР, синтезованих на гліцерині, налічується дуже мало.

Вплив ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, одержаних середовищі за наявності індуктора, на прикріплення *Candida tropicalis* РЕ-2 до абіотичних поверхонь

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Адгезія, % за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)											
			Сталь				Кахель				Лінолеум			
			64	32	16	8	64	32	16	8	64	32	16	8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		68	60	78	90	61	68	74	85	67	76	80	95
	Живі клітини	МПА	45	73	82	92	47	67	75	85	50	65	73	88
	Інактивовані клітини		46	59	67	81	49	61	67	84	55	75	75	90
	Супернатант		57	73	87	92	55	73	82	88	68	75	80	95
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	55	73	77	86	55	73	82	94	45	70	80	83
	Інактивовані клітини		57	73	81	81	52	62	80	91	58	68	75	94
	Супернатант		59	63	73	95	61	63	88	94	65	70	82	89
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		70	76	82	95	61	72	80	96	60	66	72	84
	Живі клітини	Рідке з глюкозою	46	58	78	89	38	54	72	85	40	60	75	90
	Інактивовані клітини		61	71	75	89	58	64	80	91	65	77	84	94
	Супернатант		49	71	78	86	52	68	82	92	50	75	80	90

До прикладу, науковцями кафедри біотехнології та екологічного контролю (Пирог, & Іванов, 2022) встановили антиадгезивну дію поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих у середовищі з очищеним гліцерином та відходами виробництва біодизелю за наявності біологічного індуктора *B. subtilis* БТ-2 у різному фізіологічному стані, щодо тест-культур *B. subtilis* БТ-2, *P. vulgaris* ПА-12, *E. cloacae* С-8, *S. aureus* БМС-1, *C. tropicalis* РЕ-2, *C. albicans* Д-6. Так інгібування адгезії зазначених бактерій та дріжджів до сталі та лінолеуму було найефективнішим за обробки ПАР, отриманих за внесення живих або інактивованих клітин індуктора, порівняно із супернатантом. Антиадгезивна активність таких ПАР у концентрації 96

мкг/мл становила 33-96%, у порівнянні з ПАР, отриманих на середовищі без індуктора (16-70%).

У інших статтях (Pirog, 2020; Пирог, 2022) внесення бактеріальних індукторів у середовище культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 з етанолом супроводжувалося утворенням ПАР, після обробки якими у концентраціях 12-24 мкг/мл адгезія клітин *S. aureus* БМС-1 та *C. albicans* Д-6 на абіотичних поверхнях становила 7-39 % і була нижчою, порівняно з ПАР, отриманих за відсутності індукторів (33-87%).

У разі внесення у середовище культивування *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 з відходами виробництва біодизелю та відпрацьованою соняшниковою олією живих та інактивованих клітин *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 зафіксували синтез ПАР, після обробки якими у концентрації 40 мкг/мл адгезія бактеріальних тест-культур на полістиролі була на 16-23% нижчою порівняно з даними, встановленими для ПАР без індукторів (Пирог, Скроцька, & Шевчук, 2020).

Так, результати наших досліджень показали, що введення конкурентних грамнегативних бактерій *E. cloacae* С-8 в середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 дозволило отримати поверхнево-активні речовини з високою антиадгезивною активністю при доволі низьких концентраціях.

Отже, отримані в ході дослідження результати (табл. 4.3-4.8) свідчать про можливість посилення антиадгезивної активності ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різного ступеня очищення, внесенням у середовище культивування живих клітин біологічного індуктора *E. cloacae* С-8.

4.3. Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на здатність поверхнево-активних речовин руйнувати біоплівки

Оскільки одним із механізмів руйнування біоплівки є антимікробна активність ПАР, ми припустили, що введення біологічних індукторів у культуральне середовище продуцента ПАР супроводжуватиметься синтезом кінцевого продукту з підвищеною здатністю руйнувати біоплівки.

Результати показали, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з очищеним гліцерином та відходами виробництва біодизелю за внесення живих клітин та відповідного супернатанту *E. cloacae* С-8, отриманих у рідкому середовищі з глюкозою, ефективніше руйнували бактеріальні та дріжджові біоплівки у діапазоні концентрацій (320-640 мкг/мл), ніж ПАР, одержані на середовищі без індуктора (табл. 4.9-4.15).

Так, деструкція біоплівок грамнегативних бактерій (*E. coli* ІЕМ-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *E. cloacae* С-8) (табл. 4.9-4.11) під впливом препаратів ПАР, синтезованих у середовищі з гліцерином різної якості за наявності живих клітин *E. cloacae* С-8, отриманих на рідкому середовищі з глюкозою та відповідного супернатанту була в середньому на 12-46 і 15-32 % відповідно вищою порівняно з показниками, встановленими для препаратів, синтезованих без індуктора. Причому, високий ступінь руйнування біоплівок (у середньому 55–95 %) спостерігався у всьому діапазоні (80–640 мкг/мл) концентрацій ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю за наявності живих клітин *E. cloacae* С-8 та відповідного супернатанту.

Руйнування біоплівок грамнегативних бактерій поверхнево-активними речовинами, отриманими на очищеному гліцерині, за використання інактивованих клітин штаму С-8, вирощених на рідкому середовищі з глюкозою, було ефективним щодо *Pseudomonas* sp. МІ-2, *E. cloacae* С-8 і вищим на 15 % та 20 % відповідно, у порівнянні зі ступенем руйнування цих біоплівок ПАР, одержаними без цього індуктора. Тоді як у випадку використання ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю з використанням аналогічного індуктора, деструкція біоплівок була ефективною лише щодо *E. cloacae* С-8 і вищою на 11 % за ступінь руйнування бактеріальної біоплівки штаму С-8 поверхнево-активними речовинами, отриманими без цього індуктора.

Руйнування біоплівки *E. coli* IEM-1 під впливом ПАР, синтезованих за наявності конкурентних грамнегативних бактерій

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Руйнування (%) біоплівки за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			640	320	160	80
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		60	60	59	54
	Живі	МПА	84	74	65	66
	Інактивовані		85	53	53	46
	Супернатант		58	60	62	51
	Живі	Рідке з глюкозою	74	65	54	54
	Інактивовані		58	46	49	41
	Супернатант		84	84	71	69
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		60	55	52	41
	Живі	Рідке з глюкозою	94	95	95	73
	Інактивовані		57	44	49	39
	Супернатант		91	84	84	71

Зауважимо, що деструкція біоплівок грамнегативних бактеріальних тест-культур (табл. 4.9-4.11) була на 15–48 % та 18-25 % вищою під впливом ПАР, синтезованих у середовищі з очищеним гліцерином за наявності живих та інактивованих клітин *E. cloacae* C-8, отриманих на агаризованому середовищі, ніж після обробки препаратами, синтезованими без індуктора. Варто зазначити, що така закономірність спостерігалася лише за високих концентрацій ПАР (наприклад, 320-640 мкг/мл). Зазначимо, що супернатант після вирощування конкурентних грамнегативних бактерій, отриманий на агаризованому середовищі, виявився менш ефективним індуктором, ніж живі або інактивовані клітини. Деструкція біоплівки грамнегативних бактерій під впливом ПАР, одержаних за наявності супернатанту індуктора, отриманого з МПА, у середовищі з очищеним гліцерином, була в середньому на 12-18 % вищою, порівняно з обробкою препаратами, синтезованими без індуктора.

**Вплив конкурентних грамнегативних бактерій у середовищі культивування
A. calcoaceticus IMB В-7241 на здатність ПАР руйнувати біоплівку
Pseudomonas sp. МІ-2**

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Руйнування (%) біоплівки за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			640	320	160	80
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		55	44	41	38
	Живі	МПА	70	69	62	63
	Інактивовані		74	78	64	59
	Супернатант		67	58	52	56
	Живі	Рідке з глюкозою	74	74	68	56
	Інактивовані		70	70	74	59
	Супернатант		80	73	71	74
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		89	70	63	63
	Живі	Рідке з глюкозою	95	89	73	74
	Інактивовані		65	67	54	51
	Супернатант		90	95	63	55

Таблиця 4.11

Вплив біологічного індуктора у середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на здатність ПАР до деструкції біоплівки *E. cloacae* С-8

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Руйнування (%) біоплівки за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			640	320	160	80
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		42	43	40	44
	Живі	МПА	90	72	58	56
	Інактивовані		58	54	50	37
	Супернатант		60	47	46	39
	Живі	Рідке з глюкозою	88	79	67	67
	Інактивовані		62	59	60	55
	Супернатант		74	70	67	60
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		68	65	63	60
	Живі	Рідке з глюкозою	75	75	74	72
	Інактивовані		79	75	68	62
	Супернатант		85	80	79	78

Розглядаючи деструкцію біоплівок грампозитивних бактерій (*B. subtilis* БТ-2, *S. aureus* БМС-1) (табл. 4.12-4.13) під впливом препаратів ПАР, утворених у середовищі з гліцерином різної якості за наявності живих клітин *E. cloacae* С-8 та відповідного супернатанту, отриманих на рідкому середовищі з глюкозою, була в середньому на

12-26 % і 13-32 % відповідно вищою порівняно з показниками, встановленими для препаратів, синтезованих без індуктора. Причому високий ступінь руйнування біоплівки (у середньому 73–83 %) спостерігався лише за високих (320-640 мкг/мл) концентрацій ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю за наявності супернатанту після вирощування клітин *E. cloacae* С-8.

У той же час руйнування біоплівки грамположитивних бактеріальних тест-культур (табл. 4.12-4.13) було на 8–22 % та 4-21 % вищим під впливом ПАР, синтезованих у середовищі з очищеним гліцерином за наявності живих та інактивованих клітин *E. cloacae* С-8, отриманих на агаризованому середовищі, ніж після обробки препаратами, синтезованими без даного індуктора. Причому ступінь деструкції біоплівки *S. aureus* БМС-1 був у 3 та 5 разів вищим за дії ПАР, синтезованих у середовищі з очищеним гліцерином за наявності живих та інактивованих клітин біологічного індуктора відповідно, порівняно зі ступенем деструкції біоплівки *B. subtilis* БТ-2.

Таблиця 4.12

Вплив ПАР, синтезованих за наявності біологічного індуктора, на руйнування біоплівки *B. subtilis* БТ-2

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Руйнування (%) біоплівки за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			640	320	160	80
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		61	50	40	49
	Живі	МПА	69	63	55	50
	Інактивовані		65	53	48	37
	Супернатант		51	51	40	45
	Інактивовані	Рідке з глюкозою	63	55	58	58
	Супернатант		74	72	67	59
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		58	57	49	39
	Живі	Рідке з глюкозою	70	65	55	57
	Інактивовані		59	48	46	44
	Супернатант		73	76	62	55

Зазначимо, що ПАР, отримані на очищеному гліцерині за внесення супернатанту після вирощування конкурентних грамнегативних бактерій, отриманого на агаризованому середовищі, не спричиняли позитивного ефекту на руйнування біоплівки *B. subtilis* БТ-2, проте ступінь деструкції біоплівки *S. aureus* БМС-1 під впливом таких

ПАР був в середньому на 22 % вищим, порівняно з обробкою препаратами, синтезованими без індуктора.

На відміну від інших бактеріальних біоплівки, значне підвищення деструкції біоплівки *S. aureus* БМС-1 (табл. 4.13) та *E. cloacae* С-8 (табл. 4.11) спостерігали у разі використання ПАР, синтезованих за наявності усіх індукторів (супернатанту, живих та інактивованих клітин *E. cloacae* С-8): ступінь руйнування біоплівки був вищим на 10-32 та 11-48 %, ніж за дії препаратів, отриманих при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі без індукторів.

Таблиця 4.13

Деструкція біоплівки *S. aureus* БМС-1 за дії ПАР, синтезованих за внесення конкурентних бактерій *E. cloacae* С-8

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Руйнування (%) біоплівки за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			640	320	160	80
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		43	45	40	41
	Живі	МПА	65	69	59	60
	Інактивовані		64	64	55	45
	Супернатант		65	63	53	47
	Живі	Рідке з глюкозою	69	58	42	47
	Інактивовані		68	57	57	54
	Супернатант		62	60	54	46
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		50	48	42	41
	Живі	Рідке з глюкозою	72	60	52	46
	Інактивовані		60	54	50	45
	Супернатант		82	83	79	63

Ступінь деструкції дріжджових біоплівок (*C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2) (табл. 4.14-4.15) під впливом препаратів ПАР, утворених у середовищі з очищеним гліцерином та відходами виробництва біодизелю за наявності живих клітин *E. cloacae* С-8, отриманих на рідкому середовищі з глюкозою була в середньому на 10-28 % вищою порівняно з показниками, встановленими для препаратів, синтезованих без індуктора. Ступінь руйнування дріжджових біоплівок перевищував 80 % тільки під впливом препаратів у високих концентраціях (320-640 мкг/мл), утворених за наявності живих клітин *E. cloacae* С-8 отриманих на рідкому середовищі з глюкозою.

Підвищення ступеня деструкції біоплівки роду *Candida* (табл. 4.14-4.15) під впливом ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині відбувалося у разі використання індуктора *E. cloacae* С-8, отриманого на агаризованому середовищі, у різному фізіологічному стані, причому супернатант виявився ефективнішим індуктором, порівняно з живими та інактивованими клітинами. Так ступінь руйнування дріжджових біоплівок за дії ПАР, синтезованих під час культивування штаму ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині у середовищі з супернатантом після вирощування індуктора на агаризованому середовищі, був на 21-24 % вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, синтезованих у середовищі без індуктора. Варто зазначити, що така закономірність спостерігалася лише за високих концентрацій ПАР (наприклад, 320-640 мкг/мл). Тоді як ступінь деструкції біоплівок *C. albicans* Д-6 та *C. tropicalis* РЕ-2 під впливом ПАР, отриманих на очищеному гліцерині за додавання живих або інактивованих клітин конкурентних грамнегативних бактерій, отриманих на агаризованому середовищі, був на 13-17 % та 6-23 % вищим, порівняно з обробкою препаратами, синтезованими без індуктора.

Для порівняння ступеня руйнування біоплівки нашими поверхнево-активними речовинами та іншими відомими мікробними метаболітами, синтезованими на гліцерині, були проаналізовані літературні дані щодо їх здатності до деструкції біоплівок. Так, у роботі (Бао, Wang, Zhang, Nong, & Qi, 2017) показано, що під впливом склероціорумінів А-С, отриманих *Aspergillus sclerotiorum* SCSGAF 0053 у разі спільного культивування із живими клітинами *Penicillium citrinum* SCSGAF 0052, не виявляло позитивного ефекту на ступінь руйнування біоплівок *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *B. amyloliquefaciens* та *B. stearothermophilus*, а у випадку *S. aureus* спостерігалася навіть підвищення формування біоплівки.

Вплив біологічного індуктора у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на здатність ПАР руйнувати біоплівку *C. albicans* Д-6

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Руйнування (%) біоплівки за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			640	320	160	80
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		65	60	58	55
	Живі	МПА	82	77	78	75
	Інактивовані		78	74	69	62
	Супернатант		86	83	80	80
	Живі	Рідке з глюкозою	85	80	79	75
	Інактивовані		80	78	74	69
	Супернатант		81	78	75	71
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		75	70	67	66
	Живі	Рідке з глюкозою	85	84	81	77
	Інактивовані		82	79	75	70
	Супернатант		84	81	80	79

Таблиця 4.15

Руйнування біоплівки *C. tropicalis* PE-2 ПАР, синтезованими *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності конкурентних грамнегативних бактерій

Джерело вуглецю	Біологічний індуктор	Середовище культивування індуктора	Руйнування (%) біоплівки за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
			640	320	160	80
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)		61	52	43	41
	Живі	МПА	67	59	57	49
	Інактивовані		84	79	74	69
	Супернатант		85	80	72	71
	Живі	Рідке з глюкозою	89	85	77	67
	Інактивовані		76	68	59	57
	Супернатант		70	69	67	56
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)		70	63	60	55
	Живі	Рідке з глюкозою	83	81	76	75
	Інактивовані		80	77	75	68

У іншій праці (Gómez, Ramiro, Quesan, & de Melo Franco, 2016) автори зафіксували, що у разі спільного культивування продуцентів антимікробних сполук (*Lactococcus lactis* VB69 і VB94, *Lactobacillus sakei* MBSa1, *Lactobacillus curvatus* MBSa3) із молочнокислими бактеріями (*L. lactis* 368, *L. helveticus* 354, *L. casei* 40, *Weissella viridescens* 113) відбувався синтез бактеріоцинів, які характеризувалися доволі високою ефективністю щодо деструкції біоплівок *Listeria monocytogenes* ATCC

7644, *E. coli* O157: H7 і *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, причому повне інгібування цих біоплівки відмічали під дією *L. lactis* 368, *L. curvatus* MBSa3 і *L. sakei* MBSa1 через 24, 48 та 72 год.

У результаті спільного культивування продуцента *B. subtilis* та супернатанту після вирощування *L. rhamnosus* як біологічного індуктора були синтезовані ПАР, а саме ліпопептиди, які проявляли здатність до деструкції біоплівки тест-культури *S. aureus* ATCC 25923 після 24 год (Kimelman, & Shemesh, 2019).

Hamza зі співавт. (Hamza, Kumar, & Zinjarde, 2018) також дослідили, що інша ко-культура *S. lentus* SZ2 та *Vibrio harveyi* сприяла синтезу гліколіпідів, які характеризувалися вищою ефективністю щодо деструкції біоплівки *V. harveyi*, ніж ПАР, отримані у середовищі без даного індуктора. Так ступінь руйнування біоплівки *V. harveyi* за наявності конкурентних бактерій становив 42,43-83,95% протягом 6-72 год, що вище ніж за обробки ПАР, синтезованих без індуктора (11,84-82,69%).

У роботі (S. Hifnawy, 2020) дослідники відзначали антибіоплівкову активність новосинтезованих метаболітів (диметилфеназин-1,6-дикарбоксилат (1), монометилловий ефір феназин-1,6-дикарбонової кислоти (2), феназин-1-карбонової кислоти (3), N-(2-гідроксифеніл)-ацетамід (9) і п-анісамід (10)), отриманих за спільного культивування *Micromonospora* sp. UR56 та *Actinokineospora* sp. EG49. Так отримані метаболіти характеризувалися досить високим ступенем деструкції біоплівки *B. subtilis* ATCC29212, *S. aureus* ATCC9144, *P. aeruginosa* ATCC27853 та *E. coli* ATCC25922 – 4,91-20,29%, 11,47-75,1%, 7,39-93,98% та 34,55-57,47% відповідно, проте за дії феназин-1-карбонової кислоти не було зафіксовано позитивної активності щодо штамів ATCC9144 та ATCC29212.

Інше дослідження (Maglangit, 2020) відзначало синтез нового метаболіту-алкалоїду індолукарбазолу продуцентом *Streptomyces* sp. MA37 у співкультури з *Pseudomonas* sp., при дії якого теж не відзначали позитивної антибіоплівкової активності щодо тест-культури *S. epidermidis* у діапазоні концентрацій індолукарбазолу 0-140 мкМ.

У праці (Schneider, 2020) також описали результати щодо можливості деструкції біоплівки *S. epidermidis* рідкісними сидерофорами серратіохелінами А і С, синтезованими спільною культурою *Shewanella* sp. і *Serratia* sp. Так серратіохелін А проявив слабкий ефект руйнування біоплівки *S. epidermidis* (40%) при концентрації 200 мкМ, у той же час серратіохелін С не характеризувався видимим ефектом при аналогічній концентрації.

Результати наших досліджень показали, що введення індукторів в середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 дозволило отримати поверхнево-активні речовини, які ефективно знищують бактеріальні та дріжджові біоплівки при значно нижчих концентраціях (на кілька порядків), ніж ті, що описані в літературі.

Підсумовуючи все вищезазначене, одержані експериментальні дані (табл. 4.9-4.15) засвідчують можливість посилення здатності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 до руйнування як бактеріальних, так і дріжджових біоплівок внесенням у середовище культивування продуцента гліцерином різної якості живих клітин та відповідного супернатанту біологічного індуктора *E. cloacae* С-8.

РОЗДІЛ 5

СИНЕРГІЗМ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СУМІШІ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ ТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ КОНКУРЕНТНИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *ENTEROBACTER*

Загалом біоплівки визначають як мікробні багатовидові спільноти, які у своєму співіснуванні реалізують синергетичні взаємодії у середовищі біоплівки, що призводить до посилення патогенності та резистентності до антимікробних препаратів (Ceresa, 2021; Ceresa, 2019). Мікробні поверхнево-активні речовини характеризуються ефективною біосумісністю із іншими антимікробними агентами (Ceresa, Fracchia, Fedeli, Porta, & Vanat, 2021). Ми припустили, що використання суміші ефірної олії у поєднанні із ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованими за внесення біологічних індукторів, супроводжуватиметься підвищеною здатністю до руйнування двовидових біоплівок.

5.1. Деструкція двовидових біоплівок за дії комплексу поверхнево-активних речовин з ефірною олією чайного дерева

Результати показали, що комплексний препарат ефірної олії чайного дерева та поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у середовищі з очищеним гліцерином та відходами виробництва біодизелю за внесення живих, інактивованих клітин та відповідного супернатанту *E. cloacae* C-8, ефективніше руйнував подвійні біоплівки досліджуваних тест-культур, ніж використання таких антимікробних препаратів окремо (табл. 5.1-5.4).

Так, ступінь деструкції двовидової біоплівки *Escherichia coli* IEM-1 та *Candida albicans* Д-6 (табл. 5.1) за використання суміші ПАР, синтезованих у середовищі з гліцерином різної якості за внесення клітин *E. cloacae* C-8 у різному фізіологічному стані, з ефірною олією чайного дерева був вищим на 16-31 %, порівняно із використанням таких ПАР і ефірної олії окремо. Причому високий

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Благодир Д. О.			Розділ 5. Синергізм біологічної активності суміші ефірної олії та поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241, синтезованих за наявності конкурентних бактерій роду <i>Enterobacter</i>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							94	125
Керівник		Пирог Т. П.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В. П.						

ступінь руйнування двовидової біоплівки (у середньому 47-75 %) спостерігався у всьому діапазоні (80–640 мкг/мл) концентрацій комплексної суміші ефірної олії чайного дерева та ПАР.

Зазначимо, що руйнування подвійної біоплівки *E. coli* IEM-1 та *C. albicans* Д-6 (табл. 5.1) сумішшю ефірної олії чайного дерева та ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, за використання живих клітин штаму С-8 та відповідного супернатанту, було вищим на 19 % та 31 % відповідно, у порівнянні зі ступенем руйнування цієї біоплівки відповідними монопрепаратами антимікробних речовин. Тоді як у випадку використання комплексної суміші ефірної олії чайного дерева та ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю з використанням аналогічних індукторів, деструкція подвійної біоплівки була менш ефективною і становила 72 % та 70 % відповідно, що вище на 18 % та 16 % відповідно за ступінь руйнування бактеріально-дріжджової біоплівки за дії тільки ПАР або тільки олії.

Проте, варто зауважити, що деструкція двовидової біоплівки *E. coli* IEM-1 та *C. albicans* Д-6 (табл. 5.1) за використання суміші ефірної олії чайного дерева та ПАР, синтезованих у середовищі з відходами виробництва біодизелю за внесення інактивованих клітин *E. cloacae* С-8, становила 52-61 % у всьому діапазоні концентрацій (80–640 мкг/мл) комплексної суміші, що вище на 21-29 %, порівняно із використанням монобіоцидів. У той же час, за використання суміші ефірної олії чайного дерева та ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині з використанням аналогічного індуктора, руйнування подвійної біоплівки було лише на 15-19 % вищим у всьому діапазоні концентрацій (80–640 мкг/мл), порівняно з дією тільки поверхнево-активних речовин або тільки олії.

Встановлено, що ступінь деструкції подвійної бактеріальної біоплівки *Bacillus subtilis* БТ-2 та *Staphylococcus aureus* БМС-1 (табл. 5.2) під впливом комплексного препарату ефірної олії чайного дерева та ПАР, утворених у середовищі з гліцерином різної якості за наявності клітин *E. cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані, був в середньому на 2-21 % вищим порівняно з показниками, встановленими для монопрепаратів антимікробних речовин. Причому високий ступінь руйнування подвійної біоплівки (у середньому 70–88 %) спостерігався лише за високих (320-640 мкг/мл) концентрацій комплексної суміші ефірної олії та ПАР.

Руйнування біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 та *C. albicans* Д-6 за дії комплексу ефірної олії чайного дерева з ПАР, синтезованими *A. calcoeticus* ІМВ В-7241 за наявності біологічного індуктора, і відповідних монопрепаратів

Антимікробна сполука (субстрат для біосинтезу ПАР)	Індуктор у середовищі культивування продуцента ПАР	Руйнування (%) біоплівки за дії біоцидів у концентрації (мкг/мл)			
		640	320	160	80
Олія	-	42	39	31	27
ПАР (очищений гліцерин)	Контроль (без індуктора)	36	36	30	26
	Живі	43	40	42	36
	Інактивовані	39	37	32	32
	Супернатант	44	41	42	37
ПАР (відходи виробництва біодизелю)	Контроль (без індуктора)	30	28	26	24
	Живі	54	55	50	44
	Інактивовані	38	36	29	31
	Супернатант	54	54	51	49
Комплекс ПАР (очищений гліцерин) з олією	Контроль (без індуктора)	47	41	37	31
	Живі	62	62	57	56
	Інактивовані	58	52	52	47
	Супернатант	75	72	67	68
Комплекс ПАР (відходи виробництва біодизелю) з олією	Контроль (без індуктора)	52	49	47	41
	Живі	72	70	67	65
	Інактивовані	61	62	58	52
	Супернатант	70	68	67	68

Примітка. Під час визначення ступеня деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5%.

У той же час ступінь руйнування подвійної біоплівки грампозитивних бактеріальних тест-культур (табл. 5.2) був на 15-21 % вищим під впливом суміші ефірної олії чайного дерева та поверхнево-активних речовин, отриманих на відходах виробництва біодизелю, за використання живих клітин штаму С-8, ніж після обробки цієї біоплівки тільки ПАР або тільки олією. Причому дія комплексу ефірної олії чайного дерева у поєднанні з ПАР, синтезованими на відходах виробництва біодизелю, за використання інактивованих клітин *E. cloacae* С-8 та відповідного супернатанту, характеризувалася не менш ефективним ступенем деструкції двовидової біоплівки *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1. Так ступінь деструкції такої двовидової біоплівки становив 79% та 87 % відповідно, що вище на 11 % та 12 %, порівняно із дією цих монобіоцидів окремо.

Деструкція біоплівки *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1 за дії комплексу ефірної олії чайного дерева з ПАР, синтезованими *A. calcoeticus* ІМВ В-7241 за наявності біологічного індуктора, і відповідних монобіоцидів

Антимікробна сполука (субстрат для біосинтезу ПАР)	Індуктор у середовищі культивування продуцента ПАР	Руйнування (%) біоплівки за дії біоцидів у концентрації (мкг/мл)			
		640	320	160	80
Олія	-	64	50	46	41
ПАР (очищений гліцерин)	Контроль (без індуктора)	44	43	40	36
	Живі	75	70	72	66
	Інактивовані	70	67	60	54
	Супернатант	74	71	66	61
ПАР (відходи виробництва біодизелю)	Контроль (без індуктора)	35	30	26	23
	Живі	73	65	61	54
	Інактивовані	68	66	59	51
	Супернатант	75	69	61	58
Комплекс ПАР (очищений гліцерин) з олією	Контроль (без індуктора)	57	51	48	41
	Живі	82	75	67	66
	Інактивовані	70	72	66	61
	Супернатант	76	72	69	68
Комплекс ПАР (відходи виробництва біодизелю) з олією	Контроль (без індуктора)	65	58	53	46
	Живі	88	86	79	73
	Інактивовані	79	75	75	73
	Супернатант	87	86	78	75

Примітка. Під час визначення ступеня деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5%.

Зазначимо, що комплексна суміш ефірної олії чайного дерева та ПАР, отримана у середовищі з очищеним гліцерином за внесення живих клітин *E. cloacae* С-8 та відповідного супернатанту, була менш ефективною щодо такої бактеріальної біоплівки і вищою лише на 7 % та 2 % відповідно, порівняно з дією тільки ПАР або тільки олії. У той же час, комплекс ефірної олії та ПАР (640 мкг/мл), отриманих у середовищі з очищеним гліцерином за внесення інактивованих клітин *E. cloacae* С-8, не спричиняв позитивного ефекту на деструкцію подвійної біоплівки *B. subtilis* БТ-2 та *S. aureus* БМС-1. Проте за нижчих концентрацій (80-320 мкг/мл) подвійного комплексу ступінь деструкції такої біоплівки був в середньому на 5-7 % вищим, порівняно з обробкою антимікробними препаратами окремо.

Ступінь деструкції двовидової бактеріально-дріжджової біоплівки *B. subtilis* БТ-2 з *Candida tropicalis* РЕ-2 (табл. 5.3) за використання суміші ефірної олії чайного

дерева та ПАР, синтезованих у середовищі з гліцерином різної якості за внесення клітин *E. cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані, був вищий на 26-32 %, порівняно із використанням таких ПАР і ефірної олії окремо. Причому високий ступінь руйнування двовидової біоплівки (у середньому 78-87 %) спостерігався за високих (320–640 мкг/мл) концентрацій комплексної суміші ефірної олії чайного дерева та ПАР, одержаних на відходах виробництва гліцерину за наявності клітин *E. cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані.

Таблиця 5.3

Комплексна дія ефірної олії чайного дерева з ПАР, синтезованими *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності біологічного індуктора, і відповідних монопрепаратів на двовидові біоплівки *B. subtilis* БТ-2 з *C. tropicalis* РЕ-2

Антимікробна сполука (субстрат для біосинтезу ПАР)	Індуктор у середовищі культивування продуцента ПАР	Руйнування (%) біоплівки за дії біоцидів у концентрації (мкг/мл)			
		640	320	160	80
Олія	-	38	37	31	25
ПАР (очищений гліцерин)	Контроль (без індуктора)	33	32	28	25
	Живі	42	42	39	35
	Інактивовані	39	38	35	31
	Супернатант	42	40	37	34
ПАР (відходи виробництва біодизелю)	Контроль (без індуктора)	31	30	28	25
	Живі	56	55	53	50
	Інактивовані	49	46	44	41
	Супернатант	58	57	55	55
Комплекс ПАР (очищений гліцерин) з олією	Контроль (без індуктора)	51	49	45	42
	Живі	71	70	68	63
	Інактивовані	65	65	64	60
	Супернатант	69	66	65	62
Комплекс ПАР (відходи виробництва біодизелю) з олією	Контроль (без індуктора)	63	60	57	53
	Живі	86	87	84	82
	Інактивовані	78	76	72	67
	Супернатант	87	85	80	79

Примітка. Під час визначення ступеня деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5%.

Було зафіксовано, що руйнування подвійної біоплівки *B. subtilis* БТ-2 та *C. tropicalis* РЕ-2 (табл. 5.3) сумішшю ефірної олії чайного дерева та ПАР, отриманих на відходах виробництва біодизелю, за використання живих клітин штаму С-8, було найбільш ефективним і вищим на 30-32 %, у порівнянні зі ступенем деструкції (50-56 %) цієї біоплівки відповідними монопрепаратами антимікробних речовин. Тоді як у

випадку використання комплексу ефірної олії чайного дерева та ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю за внесення інактивованих клітин індуктора та відповідного супернатанту, ступінь деструкції бактеріально-дріжджової біоплівки був вищим на 26-30 % та 24-29 % відповідно, порівняно з дією тільки поверхнево-активних речовин або тільки олії.

Аналогічні закономірності прослідковуються й у випадку обробки двовидової біоплівки штамів БТ-2 та РЕ-2 (табл. 5.3) за використання суміші ефірної олії чайного дерева та ПАР, синтезованих у середовищі з очищеним гліцерином за внесення живих, інактивованих клітин *E. cloacae* С-8 та відповідного супернатанту. Так, ступінь деструкції такої біоплівки був вищим на 29 %, 26 % та 27 % відповідно, порівняно із використанням таких ПАР і ефірної олії окремо. Причому високий ступінь руйнування бактеріально-дріжджової біоплівки (у середньому 65-71 %) спостерігався лише за високих (320–640 мкг/мл) концентрацій комплексної антимікробної суміші ефірної олії чайного дерева та ПАР.

Встановлено, що ступінь деструкції подвійної бактеріальної біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 з *Pseudomonas* sp. МІ-2 (табл. 5.4) під впливом комплексного препарату ефірної олії чайного дерева та ПАР, утворених у середовищі з гліцерином різної якості за наявності клітин *E. cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані, був в середньому на 4-19 % вищим порівняно з показниками, встановленими для монобіоцидів. Ступінь руйнування подвійної біоплівки перевищував 75 % під впливом комплексної суміші у всьому діапазоні (80-640 мкг/мл) концентрацій.

Значне підвищення ступеня руйнування біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 з *Pseudomonas* sp. МІ-2 (табл. 5.4) спостерігалось під впливом суміші ефірної олії чайного дерева та ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині у разі використання супернатанту індуктора *E. cloacae* С-8. Так ступінь руйнування такої двовидової біоплівки був на 16-19 % вищим порівняно з показниками, встановленими за дії тільки ПАР або тільки олії. Тоді як ступінь деструкції біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 з *Pseudomonas* sp. МІ-2 під впливом суміші ефірної олії та ПАР, отриманих на очище-

ному гліцерині за додавання живих або інактивованих клітин конкурентних грамнегативних бактерій, був у середньому на 14-16 % вищим, порівняно з обробкою монопрепаратами антимікробних речовин.

У той же час комплексна суміш ефірної олії чайного дерева та ПАР, отримана у середовищі з відходами виробництва за внесення живих клітин *E. cloacae* C-8 та відповідного супернатанту, була дещо менш ефективною щодо такої бактеріальної біоплівки і вищою на 6-12 % та 10-13 % відповідно, порівняно з дією тільки ПАР або тільки олії. Тоді як комплекс ефірної олії та ПАР, отриманих у середовищі з відходами виробництва біодизелю за внесення інактивованих клітин *E. cloacae* C-8, був лише на 4-8 % вищим, порівняно з обробкою біоплівки *E. coli* IEM-1 з *Pseudomonas* sp. MI-2 антимікробними препаратами окремо (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Дія суміші ефірної олії чайного дерева з ПАР, синтезованими *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності біологічного індуктора, і відповідних монобіоцидів на двовидові бактеріальні біоплівки *E. coli* IEM-1 з *Pseudomonas* sp. MI-2

Антимікробна сполука (субстрат для біосинтезу ПАР)	Індуктор у середовищі культивування продуцента ПАР	Руйнування (%) біоплівки за дії біоцидів у концентрації (мкг/мл)			
		640	320	160	80
Олія	-	67	65	61	56
ПАР (очищений гліцерин)	Контроль (без індуктора)	60	58	53	47
	Живі	75	73	70	68
	Інактивовані	71	71	68	66
	Супернатант	74	72	70	67
ПАР (відходи виробництва біодизелю)	Контроль (без індуктора)	58	56	54	50
	Живі	81	82	80	80
	Інактивовані	79	77	73	69
	Супернатант	84	83	80	77
Комплекс ПАР (очищений гліцерин) з олією	Контроль (без індуктора)	69	67	64	60
	Живі	89	87	84	83
	Інактивовані	85	86	84	80
	Супернатант	90	88	89	84
Комплекс ПАР (відходи виробництва біодизелю) з олією	Контроль (без індуктора)	62	63	60	56
	Живі	93	90	89	86
	Інактивовані	83	82	79	77
	Супернатант	95	93	93	88

Примітка. Під час визначення ступеня деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5%.

Для порівняння ступеня деструкції двовидових біоплівок нашим комплексним біоцидом ПАР з ефірною олією чайного дерева та іншими синергічними препаратами,

що включають ефірну олію та вторинні мікробні метаболіти, отримані за внесення біологічних індукторів, було проаналізовано літературні дані щодо їх здатності до деструкції таких біоплівки. Зважаючи на те, що дослідження у даному напрямку є досить новітніми та знаходяться на експериментальних етапах, праць, у яких описано ступінь деструкції подвійних біоплівки сумішами антимікробних препаратів, налічується у обмеженій кількості.

Так, у роботі (Maione, 2022) показано, що за дії суміші біоцидів: міртенолу (складова ефірної олії мирту звичайного), каспофунгіну або меропенему ступінь деструкції бактеріально-дріжджової біоплівки *Klebsiella pneumoniae* та *S. aureus* досягає 80 %, проте є нижчим за ступінь деструкції такої біоплівки (100 %) у разі використання міртенолу як монопрепарату.

У іншій праці (Budzyńska, Różalska, Sadowska, & Różalska, 2017) автори зафіксували позитивний ефект щодо руйнування подвійної біоплівки *S. aureus* із *S. aureus* у разі її обробки полібіоцидом ефірної олії гвоздики у поєднанні антибіотиків флуконазолу і мупіроцину. Так ступінь деструкції бактеріально-дріжджової біоплівки за дії комплексної суміші ефірної олії гвоздики із мупіроцином або флуконазолом становив 58,6 % та 61,1 % відповідно, що у 4 та 10 разів є вищим, ніж за використання даних антибіотиків окремо. Відзначається, що у випадку поєднання обох антибіотиків із ефірною олією гвоздики ступінь руйнування біоплівки *S. aureus* із *S. aureus* був вищим майже у 5 разів, порівняно із дією монопрепаратів.

Scaffaro зі співавт. (Scaffaro, Lopresti, D'Arrigo, Marino, & Nostro, 2018) також дослідили синергічний ефект карвакролу (компонент ефірних олій із антимікробною дією) із полімолочною кислотою щодо руйнування двовидової біоплівки *S. aureus* і *C. albicans*. Було встановлено, що за такої комбінації препаратів ступінь деструкції бактеріально-дріжджової біоплівки досягав 88-96 %, що вище, ніж за обробки монопрепаратом карвакролом.

У роботі (Tan, Leonhard, Moser, Ma, & Schneider-Stickler, 2019) дослідники відзначали посилену дію комплексу антимікробних речовин 2-амінобензімідазолу та куркуміну на деструкцію подвійної біоплівки *S. aureus* і *C. albicans*, у порівнянні із дією

монопрепаратів. Так ступінь деструкції бактеріально-дріжджової біоплівки після обробки антимікробною комбінацією 2-амінобензімідазолу із куркуміном у концентрації 200 мкг/мл становив близько 73,3 %, що вище ніж за використання даних антимікробних препаратів окремо.

Інше дослідження (Tan, Leonhard, Moser, Ma, & Schneider-Stickler, 2020) відзначало синергічний ефект куркуміну з позитивно зарядженими наночастинками хітозану на деструкцію двовидової біоплівки *S. aureus* і *C. albicans*. Було зафіксовано, що після обробки даною сумішшю антимікробних речовин у концентрації 400 мкг/мл, руйнування полімікробної біоплівки досягало 84,36 % і було ефективніше, ніж за дії лише куркуміну (близько 70 %).

У праці (Bai, 2022) було досліджено антибіоплівкову активність суміші антимікробних препаратів наночастинок хітозану та ϵ -полі-L-лізину щодо змішаних культур *Listeria monocytogenes* і *S. aureus* та *L. monocytogenes* і *P. aeruginosa*. Результати кількісно оцінювали методом посіву, що зрештою вказало на зменшення кількості *L. monocytogenes* на 0,3 log і *S. aureus* на 0,1 log у випадку обробки даним комплексним засобом двовидової біоплівки *L. monocytogenes* і *S. aureus*. У той же час після обробки наночастиноками хітозану із ϵ -полі-L-лізином подвійної біоплівки *L. monocytogenes* і *P. aeruginosa*, кількість *L. monocytogenes* була зменшена на 2 log, а щодо *P. aeruginosa* антибіоплівкового ефекту не спостерігалось.

Cho зі співавт. (Cho, Han, Nahar, Her, Kang, & Ha, 2024) також дослідили синергічний ефект ϵ -полі-L-лізину із лізоцимом щодо деструкції подвійної біоплівки *P. aeruginosa* та *L. monocytogenes*, як патогенів харчового походження. У результаті експерименту було зафіксовано, що при обробці сумішшю лізоциму (5 мг/мл) та ϵ -полі-L-лізином (1,2 та 4 мінімальних інгібуючих концентрацій) ступінь руйнування подвійної біоплівки *P. aeruginosa* та *L. monocytogene* зменшувався на 4,2–5,0 та 3,3–4,2 log КУО/г, що на 0,5-0,7 log КУО/г вище, порівняно із дією монобіоцидів.

Pati зі співавт. (Pati, Kurata, Horseman, & Pierce, 2021) також дослідили синергічний ефект мікробного пептиду ϵ -полі-L-лізину із хітозаном щодо деструкції полімікробної біоплівки *P. aeruginosa*, *S. aureus* і *C. albicans*. У результаті дослідження було зафіксовано, що після 24-годинної обробки комбінованим біоцидом хітозаном із ϵ -

полі-L-лізином полівидової біоплівки через 24 і 48 годин культивування ступінь руйнування становив 84 % та 70 % відповідно, проте був нижчим на 16 % та 30 % порівняно із 48- та 72-годинною обробкою полімікробної біоплівки *P. aeruginosa*, *S. aureus* і *C. albicans*.

У роботі (Tabassum, Khan, Kang, Jo, Cho, & Kim, 2023) було експериментально визначено антибіоплівкову активність комбінованих біоцидів наночастинок золота з фукуїданом щодо деструкції бактеріально-дріжджових біоплівок *C. albicans* у поєднанні з *S. aureus*/*Streptococcus mutans*. За результатами кількісної оцінки методом посіву було зафіксовано підвищення руйнування двовидової біоплівки *S. aureus* та *C. albicans* зі значеннями ефективності 2,9 log КУО для *S. aureus* і 2,4 log КУО для *C. albicans* за дії такої антимікробної суміші у концентрації 2048 мкг/мл. У випадку деструкції біоплівки *C. albicans* та *S. mutans* після обробки наночастинами золота з фукуїданом у концентрації <2048 мкг/мл ефективність складала 5,8 log КУО та 4,8 log КУО для *S. mutans* та *C. albicans* відповідно. Проте, варто зауважити, що антибіоплівкова активність наночастинок золота з фукуїданом була дещо нижчою щодо двовидових біоплівок, порівняно з активністю даного препарату щодо біоплівок одного виду (6,0, 8,4, 8,0 log КУО для *S. aureus*, *S. mutans* і *C. albicans* відповідно).

Підсумовуючи все вищезазначене, результати наших досліджень (табл. 5.1-5.4) показали можливість синергізму ефірної олії чайного дерева із поверхнево-активними речовинами, синтезованими *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі культивування із гліцерином різної якості за внесення конкурентних грамнегативних бактерій *E. cloacae* С-8 у різному фізіологічному стані, з метою руйнування двовидових біоплівок.

ВИСНОВКИ

1. Незалежно від способу вирощування (агаризоване, рідке середовище) бактерій *E. cloacae* С-8 утворені за наявності цих біологічних індукторів у різному фізіологічному стані (живі, інактивовані клітини, супернатант) поверхнево-активні речовини характеризувалися вищою біологічною активністю, ніж ПАР, синтезовані у середовищі без індукторів.

2. ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різної якості (очищений гліцерин, відходи виробництва біодизелю) за внесення біологічних індукторів у різному фізіологічному стані характеризувалося вищою антиадгезивною активністю, ніж ПАР, одержані у середовищі без індуктора. Причому ПАР, отримані на відходах виробництва біодизелю за внесення *E. cloacae* С-8, відзначалися вищою антимікробною активністю, порівняно з ПАР, отриманими на очищеному гліцерині за внесення конкурентних грамнегативних бактерій у різному фізіологічному стані.

3. За використання як індуктора живих клітин *E. cloacae* С-8, вирощених на рідкому середовищі з глюкозою, спостерігали синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, використовуючи відходи виробництва біодизелю як джерело вуглецю, МІК яких щодо бактеріальних і дріжджових тест-культур були нижчими у 1,5–28 разів, порівняно з показниками ПАР, утворених у середовищі без індуктора.

4. Адгезія бактеріальних тест-культур на абіотичних матеріалах, оброблених ПАР штаму ІМВ В-7241, синтезованими на гліцерині різної якості, за внесення живих клітин штаму С-8, отриманих за різної підготовки індуктора, була на 1–26 % нижчою, ніж після обробки ПАР, отриманих без внесення конкурентних грамнегативних бактерій. Тоді як адгезія дріжджових тест-культур була в середньому на 20–42 % нижчою після обробки препаратами, отриманими на відходах виробництва біодизелю за додавання живих клітин біологічного

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Благодир Д. О.				Висновки	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							104	125
Керівник	Пирог Т. П.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В. П.							

індуктора, отриманих у рідкому середовищі з глюкозою, у порівняння з ПАР без внесення клітин *E. cloacae* C-8.

5. Використання як індуктора інактивованих клітин *E. cloacae* C-8 за різної підготовки виявилось менш ефективним: МІК ПАР, синтезованих на гліцерині різної якості за їх наявності, були нижчими у 2,3-4,6 разів, а адгезія – на 2-35% нижчою, порівняно з ПАР, отриманими у середовищі без індуктора.

6. Незалежно від способу вирощування (агаризоване, рідке середовище) *E. cloacae* C-8 внесення живих клітин цих бактерій у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з гліцерином різного ступеня очищення супроводжувалося синтезом ПАР ступінь руйнування біоплівки після обробки якими був на 10–48 % вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, одержаних у середовищі без індуктора. Аналогічний ступінь деструкції біоплівки був встановлений й за використання супернатанту після вирощування індуктора. Використання як індуктора інактивованих клітин *E. cloacae* C-8 виявилось менш ефективним: деструкція біоплівки після обробки ПАР, синтезованих за їх наявності, були нижчими – на 4-25 % вищою порівняно з ПАР, отриманими у середовищі без індуктора.

7. Встановлено можливість синергізму ефірної олії чайного дерева із поверхнево-активними речовинами, синтезованими *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі культивування із гліцерином різної якості за внесення конкурентних грамнегативних бактерій *E. cloacae* C-8 у різному фізіологічному стані, з метою руйнування двовидових біоплівок. Так, ступінь деструкції двовидових бактеріальних біоплівок за обробки сумішшю ПАР, синтезованих у середовищі з гліцерином різної якості за внесення клітин *E. cloacae* C-8 у різному фізіологічному стані, з ефірною олією чайного дерева був вищим на 2-21 %, порівняно із використанням таких ПАР і ефірної олії окремо. У той же час деструкція двовидових бактеріально-дріжджових біоплівок за дії аналогічної комбінації антимікробних препаратів була на 16-32 % вищою порівняно з показниками, встановленими для монобіоцидів.

8. Отримані результати засвідчують можливість регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення за наявності грамнегативних бактерій *E. cloacae* C-8.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Abdel-Razek, A. S., Hamed, A., Frese, M., Sewald, N., & Shaaban, M. (2018). Penicisteroid C: New polyoxygenated steroid produced by co-culturing of *Streptomyces piomogenus* with *Aspergillus niger*. *Steroids*, 138, 21–25. doi:10.1016/j.steroids.2018.06.005
2. Abdel-Wahab, N., Scharf, S., Özkaya, F., Kurtán, T., Mándi, A., Fouad, M., & Proksch, P. (2019). Induction of secondary metabolites from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* through co-cultivation with *Bacillus subtilis*. *Planta Med.*, 85(06), 503–512. doi:10.1055/a-0835-2332
3. Adetunji, A.I., & Olaniran, A.O. (2021). Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. *Saudi J. Biol. Sci.*, 28(1), 669-679. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.058.
4. Akone, S. H., Mándi, A., Kurtán, T., Hartmann, R., Lin, W., Daletos, G., & Proksch, P. (2016). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungal–bacterial co-culture and epigenetic modification. *Tetrahedron*, 72(41), 6340–6347. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.08.022>
5. Bai, X., Xu, L., Singh, A.K., Qiu, X., Liu, M., Abuzeid, A., El-Khateib, T., & Bhunia, A.K. (2022). Inactivation of Polymicrobial Biofilms of Foodborne Pathogens Using Epsilon Poly-L-Lysin Conjugated Chitosan Nanoparticles. *Foods*, 11(4), 569. doi: 10.3390/foods11040569.
6. Bansal, N., Dasgupta, D., Hazra, S., Bhaskar, T., Ray, A., & Ghosh, D. (2020). Effect of utilization of crude glycerol as substrate on fatty acid composition of an oleaginous yeast *Rhodotorula mucilagenosa* IPL32: Assessment of Nutritional Indices. *Bioresour. Technol.*, 123330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123330>
7. Bao, J., Wang, J., Zhang, X.-Y., Nong, X.-H., & Qi, S.-H. (2017). New furanone derivatives and alkaloids from the co-culture of marine-derived fungi *Aspergillus sclerotiorum* and *Penicillium citrinum*. *Chem. Biodiversity*, 14(3), e1600327.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
<i>Розробив</i>		<i>Благодир Д. О.</i>			Список використаної літератури			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>	
<i>Консульт.</i>											
<i>Керівник</i>		<i>Пирог Т. П.</i>						Кафедра БТМ			
<i>Н. Контр.</i>											
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В. П.</i>									

doi:10.1002/cbdv.201600327

8. Basal, W. T., Issa, A. M., Mohammed, S. E. S., & Mazen, S. A.-E. (2020). In vivo evaluation of the toxicity, genotoxicity, histopathological, and anti-inflammatory effects of the purified bioglycerol byproduct in biodiesel industry. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 18, 61. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00079-x>

9. Baskaran, S. M., Zakaria, M. R., Mukhlis Ahmad Sabri, A. S., Mohamed, M. S., Wasoh, H., Toshinari, M., & Banat, I. M. (2021). Valorization of biodiesel side stream waste glycerol for rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* RS6. *Environ. Pollut.*, 276 (116742). doi:10.1016/j.envpol.2021.116742

10. Bezerra, K. G. O., Gomes, U. V. R., Silva, R. O., Sarubbo, L. A., & Ribeiro, E. (2019). The potential application of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* TGC01 using crude glycerol on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Biodegradation*, 30(4), 351-361. doi:10.1007/s10532-019-09883-w

11. Bharali, P., Singh, S.P., Dutta, N., Gogoi, S., Bora, L.C., & Debnath, P. (2014). Bio-diesel derived waste glycerol as an economic substrate for biosurfactant production using indigenous *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*, 4(73), 38698-38706. doi:10.1039/c4ra05594b

12. Bindea, M., Rusu, B., & Rusu, A. (2018). Valorification of crude glycerol for pure fractions of docosahexaenoic acid and β -carotene production by using *Schizochytrium limacinum* and *Blakeslea trispora*. *Microb. Cell Fact.*, 17, 97. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0945-4>

13. Biniarz, P., Coutte, F., & Gancel, F. (2018). High-throughput optimization of medium components and culture conditions for the efficient production of a lipopeptide pseudofactin by *Pseudomonas fluorescens* BD5. *Microb. Cell Fact.*, 17(121). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0968-x>

14. Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37(8), 911–917

15. Boonyarit, J., Polburee, P., Khaenda, B., Zhao, Z.K., & Limtong, S. (2020). Lipid Production from Sugarcane Top Hydrolysate and Crude Glycerol with *Rhodospiridiobolus*

fluvialis Using a Two-Stage Batch-Cultivation Strategy with Separate Optimization of Each Stage. *Microorganisms*, 8(453). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030453>

16. Borrero-de Acuña, J.M., Rohde, M., Saldias, C., & Poblete-Castro, I. (2021). Fed-Batch mcl-Polyhydroxyalkanoates Production in *Pseudomonas putida* KT2440 and 1phaZ Mutant on Biodiesel-Derived Crude Glycerol. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9(642023). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.642023>

17. 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.

18. Bunsangiam, S., Thongpae, N., & Limtong, S. (2021). Large scale production of indole-3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth. *Sci. Rep.*, 11 (13094). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92305-w>

19. Cannazza, P., Rissanen, A.J., Guizelini, D., Losoi, P., Sarlin, E., Romano, D., & Mangayil, R. (2021). Characterization of *Komagataeibacter* Isolate Reveals New Prospects in Waste Stream Valorization for Bacterial Cellulose Production. *Microorganisms*, 9, 2230. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112230>

20. 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/pharmaceutics1304046

21. 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. *Front. Microbiol.*, 11, 545654. doi:10.3389/fmicb.2020.545654.

22. Ceresa, C., Tessarolo, F., Maniglio, D., Tambone, E., Carmagnola, I., Fedeli, E., & Fracchia, L. (2019). Medical-Grade Silicone Coated with Rhamnolipid R89 Is Effective against *Staphylococcus* spp. Biofilms. *Molecules*, 24(21), 3843. doi:10.3390/molecules24213843

23. Chan, H.S., Xiao, K., Tsang, T.H., Zeng, C., Wang, B., Peng, X., & Wong, P.K. (2021). Bioremediation of Crude Glycerol by a Sustainable Organic-Microbe Hybrid System. *Front Microbiol.*, 12(654033). doi.10.3389/fmicb.2021.654033
24. Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., Sayadi, S., Chamkha, M., & Banat, I.M. (2017). Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *J. Basic Microbiol.*, 57(5), 364–375. doi: 10.1002/jobm.201600658
25. Chmielarz, M., Blomqvist, J., Sampels, S., Sandgren, M., & Passoth, V. (2021). Microbial lipid production from crude glycerol and hemicellulosic hydrolysate with oleaginous yeasts. *Biotechnol. Biofuels.*, 14(1), 65, doi: 10.1186/s13068-021-01916-y.
26. Cho, A.J., Han, S., Nahar, S., Her, E., Kang, J.G., & Ha, S.D. (2024). Synergistic effects of ϵ -poly-l-lysine and lysozyme against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* biofilms on beef and food contact surfaces. *Meat Sci.*, 214, 109534. doi: 10.1016/j.meatsci.2024.109534.
27. Czurko, D., Chebbi, A., Kruszelnicki, M., Czapor-Irzabek, H., Urbanek, A.K., Polowczyk, I., & Janek, T. (2023). Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from a new strain of *Pseudomonas antarctica* 28E using crude glycerol as a carbon source. *RSC Adv.*, 13(34), 24129-24139. doi.10.1039/d3ra03408a
28. Crosse, A. J., Brady, D., Zhou, N., & Rumbold, K. (2019). Biodiesel's trash is a bio-refineries' treasure: the use of “dirty” glycerol as an industrial fermentation substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 36(1), 2. doi: 10.1007/s11274-019-2776-9.
29. de Alteriis, E., Lombardi, L., Falanga, A., Napolano, M., Galdiero, S., Siciliano, A., & Galdiero E. (2018). Polymicrobial antibiofilm activity of the membranotropic peptide gH625 and its analogue. *Microb. Pathog.*, 125, 189-195. doi: 10.1016/j.micpath.2018.09.027.
30. Dikshit, P.K., & Kim, B.S. (2020). Bacterial cellulose production from biodiesel-derived crude glycerol, magnetic functionalization, and its application as carrier for lipase immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.*, 153, 902-911. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.04
31. Dikshit, P.K., Kharmawlong, G.J., & Moholkar, V.S. (2018). Investigations in sonication-induced intensification of crude glycerol fermentation to dihydroxyacetone by

free and immobilized *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.*, 256, 302–311. doi:10.1016/j.biortech.2018.02.02

32. Dubey, S., & Mishra, S. (2021). Efficient Production of Polyhydroxyalkanoate Through Halophilic Bacteria Utilizing Algal Biodiesel Waste Residue. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9, 624859. doi:10.3389/fbioe.2021.624859

33. El-Hawarry, W. N., Shourbela, R. M., Haraz, Y. G., Khatab, S. A., & Dawood, M. A. O. (2021). The influence of carbon source on growth, feed efficiency, and growth-related genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under biofloc conditions and high stocking density. *Aquaculture*, 542, 736919. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736919>

34. Giacomobono, R., Albergo, R., Valerio, V., Caporusso, A., & De Bari, I. (2022). Modelling of the Citric Acid Production from Crude Glycerol by Wild-Type *Yarrowia lipolytica* DSM 8218 Using Response Surface Methodology (RSM). *Life*, 12(621). <https://doi.org/10.3390/life12050621>

35. Glycerol Market 2020 and Forecast 2021-2027. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.trustedbusinessinsights.com/details/glycerol-market-2020-and-forecast-2021-2027>

36. Gomes, M.-Z.V., & Nitschke, M. (2012). Evaluation of rhamnolipids surfactants as agents to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polystyrene surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49(1), 960–965

37. Gómez, N. C., Ramiro, J. M. P., Quecan, B. X. V., & de Melo Franco, B. D. G. (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. *Front. Microbiol.*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00863

38. Grădinaru, A. C., Trifan, A., Şpac, A., Brebu, M., Miron, A., & Aprotosoiaie, A. C. (2018). Antibacterial activity of traditional spices against lower respiratory tract pathogens: combinatorial effects of *Trachyspermum ammi* essential oil with conventional antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.*, 67(5), 449-457. doi:10.1111/lam.13069

39. 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 Microb. Technol.*, 114, 33–39. doi:10.1016/j.enzmictec.2018.03.008

40. Ho Jin, Y., Lee, T., Kim, J.R., Choi, Y.-E., & Park, C. (2019). Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Ind. Eng. Chem.*, 75, 158–163. doi:10.1016/j.jiec.2019.03.017

41. Iyyappan, J., Baskar, G., Bharathiraja, B., & Gopinath, M. (2020). Enhanced malic acid production using *Aspergillus niger* coupled with In situ product recovery. *Bioresour. Technol.*, 308 (123259). doi:10.1016/j.biortech.2020.12325

42. Iyyappan, J., Bharathiraja, B., Baskar, G., & Kamalanaban, E. (2019). Process optimization and kinetic analysis of malic acid production from crude glycerol using *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.*, 281, 18–25. doi:10.1016/j.biortech.2019.02.06

43. Jagtap, S.S., Bedekar, A.A., & Singh, V. (2021). Metabolic engineering of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* PO1f for production of erythritol from glycerol. *Biotechnol. Biofuels.*, 14, 188. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02039-0>

44. Janek, T., Gudiña, E.J., Połomska, X., Biniarz, P., Jama, D., Rodrigues, L.R., & Lazar, Z. (2021). Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. *Molecules*, 26 (3488). <https://doi.org/10.3390/molecules26123488>

45. Jeong, G., Khan, F., Tabassum, N., Cho, K., & Kim, Y. (2024). Strategies for controlling polymicrobial biofilms: A focus on antibiofilm agents. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 64(2), 107243. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2024.107243.

46. Jiang, L.L., Liu, F.Y., Yang, W., Li, C.L., Zhu, B.W., & Zhu, X.H. (2021). Production of 1,3-propanediol and lactic acid from crude glycerol by a microbial consortium from intertidal sludge. *Biotechnol. Lett.*, 43(3), 711–717. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03063-0>

47. Jiang, Y., Matsumoto, T., Kuranaga, T., Lu, S., Wang, W., Onaka, H., & Kakeya, H. (2021). Longicatenamides A–D, two diastereomeric pairs of cyclic hexapeptides produced by combined-culture of *Streptomyces* sp. KUSC_F05 and *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596. *J. Antibiot.*, 74(5), 307–316. doi:10.1038/s41429-020-00400-3

48. Ju, J.H., Heo, S.Y., Choi, S.W., Kim, Y.M., Kim, M.S., Kim, C.H., & Oh, B.R. (2021). Effective bioconversion of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol using organic acid resistance-enhanced *Lactobacillus reuteri* JH83. *Bioresour Technol.*, 337(125361). doi: 10.1016/j.biortech.2021.125361.
49. Karayannis, D., Papanikolaou, S., Vatistas, C., Paris, C., & Chevalot, I. (2023). Yeast Lipid Produced through Glycerol Conversions and Its Use for Enzymatic Synthesis of Amino Acid-Based Biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(714). <https://doi.org/10.3390/ijms24010714>
50. Karlsson, J., Ramin, M., Kass, M., Lindberg, M., & Holtenius, K. (2019). Effects of replacing wheat starch with glycerol on methane emissions, milk production, and feed efficiency in dairy cows fed grass silage-based diets. *J. Dairy Sci.*, doi:10.3168/jds.2018-15629
51. Kaur, J., Sarma, A. K., Jha, M. K., & Gera, P. (2020). Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnol. Rep.*, e00487. doi:10.1016/j.btre.2020.e00487
52. Kimelman, H., & Shemesh, M. (2019). Probiotic Bifunctionality of *Bacillus subtilis* – Rescuing Lactic Acid Bacteria from Desiccation and Antagonizing Pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 7(10), 407. doi:10.3390/microorganisms710040
53. Kot, A.M., Błażej, S., & Kieliszek, M. (2019). Simultaneous Production of Lipids and Carotenoids by the Red Yeast *Rhodotorula* from Waste Glycerol Fraction and Potato Wastewater. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 189, 589–607. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03023-z>
54. Książek, E.E., Janczar-Smuga, M., Pietkiewicz, J.J., & Walaszczyk, E. (2023). Optimization of Medium Constituents for the Production of Citric Acid from Waste Glycerol Using the Central Composite Rotatable Design of Experiments. *Molecules*, 28(3268). <https://doi.org/10.3390/molecules28073268>
55. Kumar, A., Singh, S.K., Kant, C., Verma, H., Kumar, D., Singh, P.P., Modi, A., & Kumar, M. (2021). Microbial biosurfactant: a new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1472, doi: 10.3390/antiox10091472.

56. Kumar, L. R., Yellapu, S. K., Tyagi, R. D., & Zhang, X. (2019). A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Biores. Technol.*, 122155. doi:10.1016/j.biortech.2019.122155
57. Lascu, I., Tănase, A.M., Jablonski, P., Chiciudean, I., Preda, M.I., Avramescu, S., & Stoica, I. (2022). Revealing the Phenotypic and Genomic Background for PHA Production from Rapeseed-Biodiesel Crude Glycerol Using *Photobacterium ganghwense* C2.2. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(13754). <https://doi.org/10.3390/ijms232213754>
58. Lee, S., Abraham, A., Lim, A.C.S., Choi, O., Seo, J.G., & Sang, B.I. (2021). Characterisation of bacterial nanocellulose and nanostructured carbon produced from crude glycerol by *Komagataeibacter sucrofermentans*. *Bioresour. Technol.*, 342(125918). doi:10.1016/j.biortech.2021.12591
59. Liang, L., Sproule, A., Haltli, B., Marchbank, D. H., Berru e, F., Overy, D. P., & Kerr, R. G. (2019). Discovery of a new natural product and a deactivation of a quorum sensing system by culturing a “producer” bacterium with a heat-killed “inducer” culture. *Front. Microbiol.*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.03351
60. Liang, L., Wang, G., Haltli, B., Marchbank, D. H., Stryhn, H., Correa, H., & Kerr, R. G. (2020). Metabolomic comparison and assessment of co-cultivation and a heat-killed inducer strategy in activation of cryptic biosynthetic pathways. *J. Nat. Prod.*, 83(9), 2696-2705. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00621.
61. Lim, H. J., An, J. S., Bae, E. S., Cho, E., Hwang, S., Nam, S. J., Oh, K. B., Lee, S. K., & Oh, D. C. (2022). Ligiamycins A and B, decalin-amino-maleimides from the co-culture of *Streptomyces* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from the marine wharf roach, *Ligia exotica*. *Mar. Drugs.*, 20(2), 83. doi: 10.3390/md20020083.
62. Liu, H., Chen, H., Sun, Y., Zhang, X., Lu, H., Li, J., & Zhou, T. (2019). Characterization of the mechanism and impact of staphylokinase on the formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *J. Med. Microbiol.*, 68(3), 355-367. doi: 10.1099/jmm.0.000914
63. Liu, P., Liu, J.-S., Zhang, B., Liu, Z.-Q., & Zheng, Y.-G. (2020). Increasement of O-acetylhomoserine production in *Escherichia coli* by modification of glycerol-oxidative

pathway coupled with optimization of fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 43(1), 105–117. doi:10.1007/s10529-020-03031-8

64. Liu, Y., Zhong, B., & Lawal, A. (2022). Recovery and utilization of crude glycerol, a biodiesel byproduct. *RSC Adv.*, 12(43), 27997–28008. doi: 10.1039/d2ra05090k.

65. Louvado, A., Coelho, F.J.R.C., & Palma, M. (2020). Effect of glycerol feed-supplementation on seabass metabolism and gut microbiota. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104, 8439–8453. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10809-3>

66. Luti, K.J.K., 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*. *J. Al-Nahrain. Univ.*, 21(2), 98–105.

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

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. Makarevičienė, V., Kazancev, K., Sendžikienė, E., & Gumbytė, M. (2023). Glycerol free biodiesel synthesis by application of methyl formate in enzymatic interesterification of rapeseed oil. *GCLR.*, 16, 1. doi:10.1080/17518253.2023.2215259

70. Matevosyan, L., Bazukya, I., & Trchounian, A. (2019). Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BMC Microbiol.*, 19(1), 46–63. doi: 10.1186/s12866-019-1475-x.

71. Méndez-Líter, J.A., de Eugenio, L.I., Hakalin, N.L.S., Prieto, A., & Martínez, M.J. (2021). Production of a β -Glucosidase-Rich Cocktail from *Talaromyces amestolkiae* Using Raw Glycerol: Its Role for Lignocellulose Waste Valorization. *J. Fungi*, 7, 363. <https://doi.org/10.3390/jof7050363>

72. Mitrea, L., Trif, M., & Cătoi, A.F. (2017). Utilization of biodiesel derived-glycerol for 1,3-PD and citric acid production. *Microb. Cell. Fact.*, 16, 190. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0807-5>.

73. Mohd Zain, N. F., Paramasivam, M., Tan, J. S., Lim, V., & Lee, C. K. (2020). Response surface methodology optimization of polyhydroxyalkanoate production by *Burkholderia cepacia* BPT1213 using waste glycerol from palm oil-based biodiesel production. *Biotechnol. Prog.*, e3077. <https://doi.org/10.1002/btpr.3077>
74. Mota, C.J.A., Peres Pinto, B., & de Lima, A.L. (2017). Glycerol Utilization. In: *Glycerol*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59375-3_2
75. Muelas, A., Remacha, P., Pina, A., Barroso, J., Sobrino, A., Aranda, D., & Ballester, J. (2020). Combustion of crude glycerol and its blends with acetals. *Exp. Therm. Fluid Sci.*, 114, 110076. doi:10.1016/j.expthermflusci.2020
76. Pati, B. A., Kurata, W. E., Horseman, T. S., & Pierce, L. M. (2021). Antibiofilm activity of chitosan/ epsilon-poly-L -lysine hydrogels in a porcine ex vivo skin wound polymicrobial biofilm model. *Wound Repair Regen.*, 29(2), 316–326. doi:10.1111/wrr.12890
77. Pirog, Lutsai, D.A., & Muchnyk, F.V. (2021). Biotechnological potential of the *Acinetobacter* genus bacteria. *Mikrobiol. Zhurn.*, 83(3), 65–82. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.03.092>
78. Pirog, Lutsay, D.A., Kliuchka, L.V., & Beregova, K.A. (2019). Antimicrobial activity of surfactants of microbial origin. *Biotechnol. Acta*, 12(1), 39–57. <https://doi.org/10.15407/biotech12.01.039>
79. 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 Microb. Technol.*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109677>.
80. Pirog, T.P., Shevchuk, T. A., Voloshina, I. N., & Gregirchak, N. N. (2005). Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 41(1), 51-55. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0010-z>
81. Podleśny, M., Wyrostek, J., Kucharska, J., Jarocki, P., Komoń-Janczara, E., & Targoński, Z. (2019). A New Strategy for Effective Succinic Acid Production by *Enterobacter* sp. LU1 Using a Medium Based on Crude Glycerol and Whey Permeate. *Molecules*, 24(4543). <https://doi.org/10.3390/molecules24244543>

82. Prabhu, A.A., Thomas, D.J., & Ledesma-Amaro, R. (2020). Biovalorisation of crude glycerol and xylose into xylitol by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell Fact.*, 19(121). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01378-1>
83. Rakicka-Pustułka, M., Ziuzia, P., Pierwoła, J., Szymański, K., Wróbel-Kwiatkowska, M., & Lazar, Z. (2022). The microbial production of kynurenic acid using *Yarrowia lipolytica* yeast growing on crude glycerol and soybean molasses. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 10:936137. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.936137>
84. Robert, J.M., Betancur, M.O., Machado, A.C.O., Arruda, A., Reis, V.C.B., Almeida, R.V., & Freire, D.M.G. (2019). Increase of *Candida antarctica* lipase B production under PGK promoter in *Pichia pastoris*: effect of multicopies. *Braz. J. Microbiol.*, 50, 405–413. doi:10.1007/s42770-019-00056-8
85. Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., & Campos-Takaki, G.M. (2011). Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 84(1), 1–5. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.10.045.
86. Rzechonek, D.A., Dobrowolski, A., Rymowicz, W., & Mirończuk, A.M. (2018). Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.*, 271, 340-344. doi:10.1016/j.biortech.2018.09.11
87. S. Hifnawy, M., Hassan, H. M., Mohammed, R., M. Fouda, M., Sayed, A. M., A. Hamed, 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. *Mar. Drugs*, 18(5), 243. doi:10.3390/md18050243
88. Scaffaro, R., Lopresti, F., D'Arrigo, M., Marino, A., & Nostro, A. (2018). Efficacy of poly(lactic acid)/carvacrol electrospun membranes against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in single and mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102(9), 4171–4181. doi: 10.1007/s00253-018-8879-7.
89. Schneider, Y., Jenssen, M., Isaksson, J., Hansen, K. Ø., Andersen, J. H., & Hansen, E. H. (2020). Bioactivity of Serratiochelin A, a Siderophore Isolated from a Co-Culture of *Serratia* sp. and *Shewanella* sp. *Microorganisms*, 8(7), 1042. doi:10.3390/microorganisms8071042

90. Setyawan, H. Y., Zhu, M., Zhang, Z., & Zhang, D. (2016). Ignition and combustion characteristics of single droplets of a crude glycerol in comparison with pure glycerol, petroleum diesel, biodiesel and ethanol. *Energy*, 113, 153–159. doi:10.1016/j.energy.2016.07.032
91. Shamikh, Y. I., El Shamy, A. A., Gaber, Y., Abdelmohsen, U. R., Madkour, H. A., Horn, H., & Hozzein, W. N. (2020). Actinomycetes from the red sea sponge *Coscinoderma mathewsi*: isolation, diversity, and potential for bioactive compounds discovery. *Microorganisms*, 8(5), 783. doi:10.3390/microorganisms8050783
92. Shi, X., Park, H.M., & Kim, M. (2022). Isopropanol biosynthesis from crude glycerol using fatty acid precursors via engineered oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell. Fact.*, 21(168). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01890-6>
93. Sniegoňová, P., Holub, J., Chujanov, O., Špačková, D., Blažková, J., & Márová, I. (2023). Conversion of Mixed Waste Food Substrates by Carotenogenic Yeasts of *Rhodotorula* sp. *Genus. Microorganisms*, 11(4), 1013. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041013>
94. Song, Z., Ma, Z., Bechthold, A., & Yu, X. (2020). Effects of addition of elicitors on rimocidin biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M527. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104(10), 4445–55. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10565-4>
95. 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. *Mar. Drugs*, 15(8), 250. doi:10.3390/md15080250
96. Szczepańska, P., Rychlicka, M., Moroz, P., Janek, T., Gliszczyńska, A., & Lazar, Z. (2022). Elevating Phospholipids Production *Yarrowia lipolytica* from Crude Glycerol. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(18), 10737. <https://doi.org/10.3390/ijms231810737>
97. Sotkowski, M., Plhalová, Ž., Sniegoňová, P., Holub, J., Chujanov, O., Špačková, D., Blažková, J., & Márová, I. (2023). Conversion of Mixed Waste Food Substrates by Carotenogenic Yeasts of *Rhodotorula* sp. *Genus. Microorganisms*, 11(4), 1013. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041013>
98. Tabassum, N., Khan, F., Kang, M.G., Jo, D.M., Cho, K.J., & Kim, Y.M. (2023). Inhibition of Polymicrobial Biofilms of *Candida albicans*-*Staphylococcus*

aureus/*Streptococcus mutans* by Fucoidan-Gold Nanoparticles. *Mar. Drugs*, 21(2), 123. doi: 10.3390/md21020123.

99. Tan, J.P., Tee, Z.K., Wan Isahak, W.N.R., Kim, B.H., Asis, A.J., & Md Jahim, J. (2018). Improved fermentability of pretreated glycerol enhanced bioconversion of 1,3-propanediol. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 57(37), 12565–12573. doi:10.1021/acs.iecr.8b02268

100. Tan, Y., Leonhard, M., Moser, D., Ma, S., & Schneider-Stickler, B. (2019). Antibiofilm efficacy of curcumin in combination with 2-aminobenzimidazole against single- and mixed-species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 174, 28–34. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.10.079

101. Tan, Y., Ma, S., Moser, D., Han, F., Leonhard, M., & Schneider-Stickler, B. (2020). Preparation and antibiofilm studies of curcumin loaded chitosan nanoparticles against polymicrobial biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr. Polym.*, 241, 116254. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116254.

102. Vivek, N., Sindhu, R., Madhavan, A., Anju, A. J., Castro, E., Faraco, V., & Binod, P. (2017). Recent advances in the production of value-added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate – Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview. *Biores. Technol.*, 239, 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.056>

103. Wang, K., Liu, N., Shang, F., Huang, J., Yan, B., Liu, M., & Huang, Y. (2021). Activation of secondary metabolism in red soil-derived Streptomycetes via co-culture with Mycolic Acid-Containing Bacteria. *Microorganisms*, 9(11), 2187. doi: 10.3390/microorganisms9112187.

104. Wang, X.L., Zhou, J.J., & Liu, S. (2022). In situ carbon dioxide capture to co-produce 1,3-propanediol, biohydrogen and micro-nano calcium carbonate from crude glycerol by *Clostridium butyricum*. *Biotechnol. Biofuels.*, 15(91). <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02190-2>

105. Wang, X.L., Zhou, J.J., Shen, J.T., Zheng, Y.F., Sun, Y., & Xiu, Z.L. (2020). Sequential fed-batch fermentation of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* DL07. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104(21), 9179–9191. doi:10.1007/s00253-020-10931-2

106. Wang, Y.D., Liao, J.Y., & Chiang, C.J. (2019). A simple strategy to effectively produce D-lactate in crude glycerol-utilizing *Escherichia coli*. *Biotechnol. Biofuels.*, 12(273). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1615-4>
107. Wang, Z., Ning, T., Gao, K., He, X., & Zhang, H. (2019). Utilization of glycerol and crude glycerol for polysaccharide production by an endophytic fungus *Chaetomium globosum* CGMCC 6882. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 49(8), 807-812. doi:10.1080/10826068.2019.1621895
108. Yang, S., Pan, X., Wang, Q., Lv, Q., Zhang, X., Zhang, R., & Rao, Z. (2022). Enhancing erythritol production from crude glycerol in a wild-type *Yarrowia lipolytica* by metabolic engineering. *Front. Microbiol.*, 13(1054243). doi.10.3389/fmicb.2022.1054243
109. Yao, P., You, S., Qi, W., Su, R., & He, Z. (2020). Investigation of fermentation conditions of biodiesel by-products for high production of β -farnesene by an engineered *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27(18), 22758–22769. doi:10.1007/s11356-020-08893-z
110. Yao, R., Li, J., & Feng, L. (2019). ^{13}C metabolic flux analysis-guided metabolic engineering of *Escherichia coli* for improved acetol production from glycerol. *Biotechnol. Biofuels.*, 12(29). doi.10.1186/s13068-019-1372-4
111. Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2023). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls*.
112. 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 *Rhinochadiella similis* 35. *Front. Microbiol.*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00915
113. Yuliana, M., Trisna, L., Sari, F., & Lunardi, V. B. (2021). Glycerol purification using reactivated spent bleaching earth from palm oil refineries: Zero-waste approach. *J. Environ. Chem. Eng.*, 9(3), 105239. doi:10.1016/j.jece.2021.105239
114. Zacchino, S. A., Butassi, E., Cordisco, E., & Svetaz, L. A. (2017). Hybrid combinations containing natural products and antimicrobial drugs that interfere with bacterial and fungal biofilms. *Phytomedicine*, 37, 14–26. doi:10.1016/j.phymed.2017.10.021

115. Zambanini, T., Sarikaya, E., & Kleineberg, W. (2016). Efficient malic acid production from glycerol with *Ustilago trichophora* TZ1. *Biotechnol. Biofuels.*, 9(67). doi.10.1186/s13068-016-0483-4
116. Zhan, Y., Sheng, B., & Wang, H. (2018). Rewiring glycerol metabolism for enhanced production of poly- γ -glutamic acid in *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Biofuels.*, 11(306). doi.10.1186/s13068-018-1311-9
117. Zhang, C., Sharma, S., Ma, C., & Zeng, A.P. (2022). Strain evolution and novel downstream processing with integrated catalysis enable highly efficient coproduction of 1,3-propanediol and organic acid esters from crude glycerol. *Biotechnol. Bioeng.*, 119(6), 1450-1466. <https://doi.org/10.1002/bit.28070>
118. Zhang, C., Wu, D., & Ren, H. (2020). Economical production of vitamin K₂ using crude glycerol from the by-product of biodiesel. *Sci. Rep.*, 10(5959). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62737-x>
119. Zhao, F., Jiang, H., Sun, H., Liu, C., Han, S., & Zhang, Y. (2019). Production of rhamnolipids with different proportions of mono-rhamnolipids using crude glycerol and a comparison of their application potential for oil recovery from oily sludge. *RSC Adv.*, 9(6), 2885-2891. Doi.10.1039/c8ra09351b.
120. Zhao, F., Wu, Y., & Wang, Q. (2021). Glycerol or crude glycerol as substrates make *Pseudomonas aeruginosa* achieve anaerobic production of rhamnolipids. *Microb. Cell Fact.*, 20, 185. doi.10.1186/s12934-021-01676-2
121. Пирог, Т. П., & Іванов, М. С. (2022). Вплив біологічних індукторів на антиадгезивну активність поверхневоактивних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241. *Наукові праці НУХТ*, 28(4), 36-46. doi.10.24263/2225-2924-2022-28-4-5
122. Пирог, Т. П., Ключка, І. В., & Ключка, Л. В. (2022). Вплив інактивованих клітин конкурентних мікроорганізмів на біологічну активність поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017. *Наукові праці НУХТ*, 28(2), 24-35. <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/37684>.

123. Пирог, Т. П., Луцай, Д.А., Шевчук, Т.А., Іутинська, Г.О., & Ельперін І.В. (2018). Антимікробна та антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на технічному гліцерині. *Мікробіол. журн.*, 80(2), 14-27.
124. 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), 35-44. [https://doi.org/ 10.15407/microbiolj82.03.035](https://doi.org/10.15407/microbiolj82.03.035).
125. Пирог, Т.П., Іванов, М.С., & Ярова, Г.А. (2021). 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
126. Світовий ринок біодизелю в 2022 році. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.apk-inform.com/uk/exclusive/topic/1528162>

ДОДАТКИ

Апробація результатів науково-дослідної роботи

Нагороди:

1. Благодир Д.О. Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на антимікробну та антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 // Диплом І-го ступеня на Всеукраїнському конкурсі студентських наукових робіт з «Біотехнології» (м. Київ, НУХТ, 11 квітня 2024 р.)

2. Переможець студентських наукових проектів за благодійної підтримки Корпорації «Артеріум» (18 червня 2024 р.).

Статті у наукових журналах

1. Pirog, T.P., Ivanov, M.S., Shevchuk, T.A., & Blagodyr, D. (2024). The effect of pro- and eukaryotic inductors on the synthesis and antimicrobial activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants. *Microbiol. Journ.*, (4), 41-52. <https://doi.org/10.15407/microbiolj86.04.041>

Тези у збірниках вітчизняних та міжнародних конференцій

1. Пирог Т.П., Іванов М.С., Благодир Д.О. Вплив на біоплівки поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності конкурентних грамнегативних бактерій // Матеріали XI Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (м. Київ, НУХТ, 8 листопада 2022 р.) – С. 339.

2. Пирог Т.П., Іванов М.С., Благодир Д.О. Деструкція бактеріальних біоплівок під впливом поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності *Enterobacter cloacae* С-8 // Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, Вид-во НФаУ, 13 жовтня 2022 р.) – С. 219.

3. Пирог Т.П., Іванов М.С., Благодир Д.О. Вплив грамнегативних бактерій на синтез поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 з високою біологічною активністю // Матеріали III міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (м. Харків, ДБТУ, 24 березня 2023 р.) – С. 111.

4. Пирог Т.П., Іванов М.С., Благодир Д.О. Деструкція дріжджових біоплівки за дії поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності грамнегативних бактерій // Матеріали 89 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, 3-27 квітня 2023 р.) ч. 1. – С. 395.

5. Пирог Т.П., Іванов М.С., Благодир Д.О. Руйнування дріжджових біоплівки під впливом поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності бактеріальних індукторів // Матеріали міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (м. Харків, ДБТУ, 27-28 квітня 2023 р.) – С. 20.

6. Пирог Т.П., Іванов М.С., Благодир Д.О. Вплив фізіологічного стану індуктора на біологічну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 // Матеріали VII міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Хімія, біотехнологія, екологія та освіта» (м. Полтава, ПДАУ, 17-18 травня 2023 р.) – С. 45.

7. Пирог Т.П.. Вплив конкурентних грамнегативних бактерій на здатність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 руйнувати бактеріальні біоплівки // Матеріали XVII міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття» (м. Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського, 19 травня 2023 р.) – С. 45

8. Пирог Т.П., Іванов М.С., Благодир Д.О. Грамнегативні конкурентні бактерії як фактор регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 // Матеріали X Науково-практичної конференції з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ «Фармак» «Наука та сучасне фармацевтичне виробництво» (м. Київ, АТ«Фармак», 28 жовтня 2022 р.) – С.87.

9. Blagodyr D.O., Ivanov M.S., Pirog T.P. Competitive gram-positive and gram-negative bacteria as a factor in the regulation of the biological activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants // Materials of the The International Scientific and

Practical Conference "Modern aspects of microbiology, virology, and biotechnology in wartime and post-war period" (Kyiv, IMV, 15-16 November 2023) – P. 29.

10. Благодир Д.О., Іванов М.С., Пирог Т.П. Вплив бактерій роду *Enterobacter* на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 // Матеріали XI Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (м. Київ, НУХТ, 7 листопада 2023 р.) – 41 с.

11. Благодир Д.О., Іванов М.С., Пирог Т.П. Використання конкурентних бактерій з метою регуляції антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин // Матеріали XI науково-практичної конференції з міжнародною участю школи молодих науковців АТ«Фармак»: «Наука та сучасне фармацевтичне виробництво» (м. Київ, АТ«Фармак», 30 листопада 2023 р.) – 6 с.

12. Благодир Д.О., Іванов М.С., Пирог Т.П. Антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності *Enterobacter cloacae* С-8 // Матеріали I Міжнародної науково-практичної online конференції, присвяченої 85-річчю з дня заснування кафедри біохімії «Сучасні досягнення експериментальної, клінічної, екологічної біохімії та молекулярної біології» (м. Харків, НФаУ, 7 березня 2024 р.) – С. 441.

13. Благодир Д.О., Іванов М.С., Пирог Т.П. Регуляція антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 за умов спільного культивування із біологічним індуктором // Матеріали IV міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (м. Харків, 22 березня 2024 р.). – С. 165.

14. Благодир Д.О., Іванов М.С., Пирог Т.П. Конкурентні грамнегативні бактерії як фактор регуляції антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 // Матеріали 90 Ювілейної Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 11-12 квітня 2024 р.). – Ч. 1. – С. 377.

15. Благодир Д.О., Іванов М.С., Пирог Т.П. Використання бактерій роду *Enterobacter* для регуляції антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 // Матеріали міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (м. Харків, ДБТУ, 25-26 квітня 2024 р.) – С. 49.

16. Благодир Д.О. Регуляція антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 за наявності конкурентних грамнегативних бактерій// Матеріали XVIII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського, 17 травня 2024 р.) – С. 48.

17. Благодир Д.О., Іванов М.С., Пирог Т.П. Антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих під час спільного культивування з конкурентними грамнегативними бактеріями // Матеріали VI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості» (м. Хмельницький, ХНТУ, 31 травня 2024 р.) – С. 71.