

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Жалюк Дарії Вікторівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Антиадгезивна активність комплексу антибіотиків з поверхнево-активними речовинами *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованими в різних умовах культивування

керівник роботи Пирог Т.П., професор, доктор біологічних наук,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 780-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2023

3. Вихідні дані до роботи Штам культури продуцента поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Синергізм антиадгезивної активності мікробних метаболітів з іншими біоцидами
Розділ 1. Синергізм антиадгезивної активності мікробних метаболітів з іншими біоцидами; Розділ 2. Синергізм антиадгезивної активності мікробних метаболітів проти багатовидових біоплівки; Розділ 3. Матеріали та методи дослідження; Розділ 4. Вплив суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та антибіотиків на адгезію бактерій до абіотичних поверхонь на деструкцію біоплівки; Розділ 5. Вплив суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 та антибіотиків на ступінь руйнування двовидових біоплівки

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Синергізм антиадгезивної активності мікробних метаболітів з іншими біоцидами	01.11.2022-20.11.2022	
2	Синергізм антиадгезивної активності мікробних метаболітів проти багатовидових біоплівок	21.11.2022-04.12.2023	
3	Матеріали та методи дослідження	05.12.2023-11.12.2023	
4	Вплив суміші поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 та антибіотиків на адгезію бактерій до абіотичних поверхонь на деструкцію біоплівок	12.12.2023-08.01.2023	
5	Вплив суміші поверхнево-активних речовин <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 та антибіотиків на ступінь руйнування двовидових біоплівок	09.01.2023-30.01.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Дарія ЖАЛЮК
(ім'я та прізвище)

Тетяна ПИРОГ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за різних умов культивування, та антибіотиків

Встановлено, що поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 в суміші з антибіотиками офлоксацином та ципрофлоксацином проявили синергічний антиадгезивний ефект щодо моновидових бактеріальних та двовидових бактеріальних, бактеріально-дріжджевих тест-культур.

Так, результати показали, що попередня обробка таких поверхонь, як сталь та кахель, сумішшю ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, отриманих на очищеному гліцерині та відходах від виробництва біодизелю, та антибіотиками у концентрації (3,8 - 60 мкг/мл) дозволила зменшити прикріплення *Proteus vulgaris* БТ-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Enterobacter cloacae* С-8 у деяких випадках більше ніж у 2 рази.

Крім того, дана суміш, у концентраціях 3,9 – 500 мкг/мл, впливала і на деструкцію попередньо сформованих біоплівки культур, наведених вище. Використання комбінації препаратів дозволило підвищити ступінь руйнування біоплівки порівняно з використанням монопрепаратів у 1,5-2 рази.

Окремо досліджувався синергічний вплив наявності індуктора у середовищі культивування поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, на ступінь руйнування біоплівки у комплексі з ципрофлоксацином та офлоксацином.

Аналогічно досліджувався ступінь руйнування біоплівки двовидових біоплівок (бактерія+бактерія, бактерія+дріжджі) при дії суміші ПАР та антибіотиків.

Кваліфікаційна робота викладена на 79 сторінках друкованого тексту, містить 19 таблиць, 1 рисунок, і складається з п'яти розділів, списку використаної літератури (60 джерел) .

Ключові слова: *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, поверхнево-активні речовини, синергізм, ципрофлоксацин, офлоксацин, багатовидові біоплівки.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	5
ВСТУП.....	8
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	11
РОЗДІЛ 1. СИНЕРГІЗМ АНТИАДГЕЗИВНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОБНИХ МЕТАБОЛІТІВ З ІНШИМИ БІОЦИДАМИ.....	11
1.1. Синергізм антиадгезивної активності первинних мікробних метаболітів з іншими біоцидами.....	12
1.1.1 Роль у руйнуванні біоплівок суміші ферментів з іншими біоцидними речовинами.....	12
1.1.2 Комбінація кислот з синтетичними антибіотиками	17
1.2. Синергічна антиадгезивна властивість вторинних мікробних метаболітів з іншими біоцидами.....	18
1.2.1 Суміш антибіотиків з іншими біоцидами.....	18
1.2.2 Комплекс мікробних поверхнево-активних речовин з біоцидами.....	21
РОЗДІЛ 2. СИНЕРГІЗМ АНТИАДГЕЗИВНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОБНИХ МЕТАБОЛІТІВ ПРОТИ БАГАТОВИДОВИХ БІОПЛІВОК	26
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	30
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	30
3.1 Об'єкти досліджень.....	30
3.2 Культивування <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017	30
3.3 Визначення концентрації поверхнево-активних речовин.....	31
3.4 Дослідження антиадгезивної дії препаратів.....	31
3.5 Дослідження здатності препаратів до руйнування мікробних біоплівок..	32

3.6 Модифікація методу визначення ступеня руйнування двовидових біоплівок.....	33
3.6.1 Метод визначення ступеня руйнування двовидової біоплівки, що складається з двох бактерій.....	34
3.6.2. Метод визначення ступеня руйнування двовидової біоплівки, що складається з бактерії та дріжджів	34

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 ТА АНТИБІОТИКІВ НА АДГЕЗІЮ БАКТЕРІЙ ДО АБІОТИЧНИХ ПОВЕРХОНЬ ТА ДЕСТРУКЦІЮ БІОПЛІВОК
..... 36

4.1. Антиадгезивна активність комплексу поверхнево-активних речовин з антибіотиками щодо бактеріальних тест-культур	37
4.1.1 <i>Proteus vulgaris</i> БТ-1	37
4.1.2. <i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2.....	39
4.1.3. <i>Enterobacter cloacae</i> С-8	41
4.2. Руйнування біоплівки тест-культур за дії комплексу поверхнево-активних речовин з антибіотиками	43
4.2.1 <i>Proteus vulgaris</i> БТ-1	43
4.2.2. <i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2.....	45
4.2.3. <i>Enterobacter cloacae</i> С-8	46
4.3 Вплив препаратів поверхнево-активних речовин, отриманих за наявності бактеріальних індукторів, у суміші з антибіотиками на ступінь руйнування біоплівки.....	50
4.3.1. <i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2.....	50
4.3.2 <i>Proteus vulgaris</i> БТ-1	52
4.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	54
4.3.4. <i>Enterobacter cloacae</i> С-8	56

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 ТА АНТИБІОТИКІВ НА СТУПІНЬ РУЙУВАННЯ ДВОВИДОВИХ БІОПЛІВОК	61
5.1 Руйнування бактеріальних біоплівоч тест-культур за дії комплексу поверхнево-активних речовин з антибіотиками	61
5.1.1 <i>Pseudomonas aureginosa</i> МІ-2 та <i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	61
5.1.2 <i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1 та <i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1.....	63
5.2 Руйнування бактеріально-дріжджових біоплівоч тест-культур за дії комплексу поверхнево-активних речовин з антибіотиками.....	65
5.2.1 <i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1 та <i>Candida albicans</i> D-6.....	65
5.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1 та <i>Candida albicans</i> D-6.....	67
ВИСНОВОК.....	70
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	71

ВСТУП

Антибіотикорезистентність основних збудників інфекційних захворювань є однією з найбільших проблем сучасної медицини. Наукова медична спільнота одноголосно погоджується з тим, що обмеження використання антибактеріальних препаратів, як єдиний шлях контролю та зменшення резистентності, є неефективним [1,2,3]. Можливими виходами з даної ситуації можливе за комплексного підходу інтенсифікація та впровадження нових біоцидних препаратів або методів, що запобігають поширенню резистентності мікроорганізмів.

За даними ВООЗ, лише в ЄС вартість лікування хворих із захворюваннями, які викликані резистентними збудниками, оцінюється приблизно в 1 500 000 000 євро на рік. Рівень антибіотикорезистентності основних збудників післяопераційних ускладнень в Україні становить серйозну проблему. Так, кількість штамів, які резистентні до одного антимікробного препарату, на сьогодні, за середньою оцінкою становить 70,7 %, до антибіотиків 2-3 класів – 37,5 % (*Staphylococcus aureus* – 31,4 %, *Enterococcus faecalis* – 37,5 %, *Escherichia coli* – 34,9 %, *Enterobacter spp.* – 47,3 %, *Pseudomonas aeruginosa* – 67,8 %), до антибіотиків 4 і більше класів – 34,4 % (*S. aureus* – 25,9 %, *E. faecalis* – 31,0 %, *E. coli* – 26,3 %, *Enterobacter spp.* – 30,3 %, *P. aeruginosa* – 50,2 %), до всіх антибактерійних засобів – 29,6 % [1,2,4].

Наприклад, резистентність бактерій роду *Pseudomonas* до пеніциліну в країнах Східної Європи (за даними Європейської системи нагляду за антибіотикорезистентністю — EARSS) у 2008 р. знаходилась в межах від 25% у Болгарії і Польщі до 50% в Угорщині і перевищувала 50% у Румунії.

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ		
		<i>№</i>	<i>П</i>				
Розроб.	Жалюк Д.В.			ВСТУП	<i>Л</i>	<i>А</i>	<i>Акруші</i>
Перевірив	Пирог Т.П.				79	8	
<i>Конс</i>					Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.						

Збільшення рівня резистентності *Pseudomonas* до β -лактамів та макролідів спостерігається у всіх країнах Європи. В той же час резистентність до левофлоксацину та інших «нових» фторхінолонів в країнах Центральної та Східної Європи знаходиться в межах від 0 до 0,9% і залишається однією з найнижчих серед часто використовуваних антибактеріальних препаратів [1,3,5].

Наведені дані демонструють, що рівень резистентності патогенів до антибіотичних препаратів в країнах Європи стрімко збільшується. Навіть не маючи актуальних даних щодо резистентності мікроорганізмів в Україні, можна зробити припущення, що у нас стан проблеми не кращий.

На сучасному етапі встановлено, що в природних умовах всі мікроби існують не як деяка кількість самостійних і ізольованих клітин, а знаходяться в складі біоплівки. Формування і поширення біоплівки відіграють найважливішу роль в розвитку патологічного процесу. Вже сьогодні за даними Центрів з контролю і профілактики захворювань США доведено, що понад 70% інфекцій людини обов'язково супроводжується утворенням біоплівки. Біоплівки викликають хронічні інфекції як у тканинах (наприклад, інфекція легенів при муковісцидозі, хронічні інфекції ран), так і на поверхні імплантованих медичних пристроїв (наприклад, ортопедичних протезів, ендотрахеальних трубок, внутрішньовенних та сечових катетерів, серцевих клапанів), які характеризуються розвитком стійких і прогресуючих захворювань [6].

Взаємодія антимікробних препаратів з мікроорганізмами, що знаходяться в складі біоплівки, вивчена досить погано. Наявні дані про ефективність антибіотиків свідчать про те, що їх активність складається з дії на ізольовані мікроорганізми (спектр активності антибіотиків) і здатність діяти на бактерії, що знаходяться в складі біоплівки, що може відбуватися тільки в разі проникнення препарату крізь поверхневу оболонку і позаклітинний матрикс спільноти [7].

Поверхнево-активні речовини здатні впливати на біоплівки як за рахунок зниження життєздатності мікробних клітин, так і зменшення їх адгезії [8].

У бакалаврській роботі було досліджено антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, отриманих

на промислових відходах, у комбінації з антибіотиками ципрофлоксацином та офлоксацином проти бактеріальних тест-культур.

Встановлено, що поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 в суміші з антибіотиками офлоксацин та ципрофлоксацин проявили синергічний антибактеріальний ефект щодо бактеріальних тест-культур.

Метою роботи було дослідження антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих в різних умовах культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, у суміші з антибіотиками ципрофлоксацином та офлоксацином.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. СИНЕРГІЗМ АНТИАДГЕЗИВНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОБНИХ МЕТАБОЛІТІВ З ІНШИМИ БІОЦИДАМИ

У даному літогляді розглянуто літературу 2011-2021 років щодо досліджень спрямованих на пошук альтернативних препаратів для активної боротьби з мікробними біоплівками. Використання комбінованих препаратів, гарна альтернатива, за рахунок різного механізму дії речовин, що входять до складу.

Для боротьби з утворенням біоплівок основних патогенних мікроорганізмів (*Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, гриби роду *Candida*) можуть бути використані натуральні мікробні препарати, отримані за допомогою мікроорганізмів.

Наприклад, ферменти (β -глюканаза, α -амілаза, ліпаза і протеаза, целюлаза, ДНКаза, проназа, трипсин, β -глюкозидаза) використовуються у комплексі як з іншими біоцидними речовинами, так і з іншими ферментами, задля підвищення ступеня руйнування біоплівок. Крім того, використовуються такі первинні метаболіти як кислоти (органічні, амінокислоти). Хоча деякі з них і не проявляють антимікробної дії, наприклад лізин, вони здатні підсилювати інгібування іншого компонента на мікробну біоплівку.

Не виключення вторинні метаболіти. Доведено, що використання різних антиадгезивних комбінації що антибіотиків, що поверхнево-активних речовин, дозволяє значно підвищити ступінь руйнування досліджуваних тест-культур у більше ніж 2 рази.

				НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ		
	№	П		Л	А	Акруші
Розроб.	Жалюк Д.В.					
Перевірив	Пирог Т.П.				79	11
Конс				Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.					
				ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД РОЗДІЛ 1. СИНЕРГІЗМ АНТИАДГЕЗИВНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОБНИХ МЕТАБОЛІТІВ З ІНШИМИ БІОЦИДАМИ		

1.1. Синергізм антиадгезивної активності первинних мікробних метаболітів з іншими біоцидами

Останніми роками було зроблено багато зусиль у дослідженні нових та ефективних комбінацій природних сполук із власними антибіоплівковими ефектами з іншими біоцидами.

У літературі є відомості про роль у руйнуванні біоплівок суміші різних біоцидів з такими первинними мікробними метаболітами як ферменти [9-8].

Розглянемо детальніше ефективні комбінації ферментів, мікробного походження, з іншими препаратами, що мають антиадгезивну властивість.

1.1.1 Роль у руйнуванні біоплівок суміші ферментів з іншими біоцидними речовинами

Упродовж 2016-2020 рр. з'явилася інформація про використання суміші різних біоцидів з такими ферментами мікробного походження як β -глюканаза, α -амілаза, ліпаза і протеаза, целюлаза, ДНКаза, проназа, трипсин, β -глюкозидаза [9-13]. Крім того, у ряді робіт встановлено синергічну дію на біоплівки суміші кількох ферментів [10,12]. У таких дослідженнях як тест-культури використовували *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Це зумовлено тим, що дані мікроорганізми є збудниками поширених інфекційних захворювань та є основними харчовими патогенами.

Ферменти використовувалися для обробки біоплівок, що утворюються в харчових зонах. Крім того, регуляторними органами схвалено застосування ферментів для очищення поверхонь, що контактують з харчовими продуктами. Ферменти вважаються інноваційним та екологічно чистим підходом до контролю біоплівки завдяки їх літичній і дисперсійній активності [9].

Відомо, що ферменти здатні до інгібування клітин ферментів за рахунок порушення цитоплазматичної мембрани бактерій.

Так для прикладу, α -амілаза здатна самотійно руйнувати утворену біоплівку *P. fluorescens* до 30% [10] за концентрації 40 СГ. У комбінації з

цетилтриметиламонію бромідом (СТАВ) (концентрація 35 мг/л), деструкція досягала 60%, що вказує на синергічну антифунгальну дію даного комплексу. Механізм дії СТАВ заснований на здатності впливати на ліпідні компоненти мембрати клітин, що призводить до їх лізису.

Інші дослідження [11] цього ж ферменту проводилися на біоплівках *E. coli*, *S. aureus* та MRSA, у комплексі з іншим ферментом - протеазою I типу. У випадку використання окремо даних ферментів у концентрації 400 Од/мл та 5 Од/мл відповідно, α -амілаза зруйнувала 40-60 % досліджуваних біоплівок тест культур, а протеаза до 90%, крім MRSA, де значення досягало близько 60%. Комбінація даних ферментів демонструвала 80-95% руйнування щодо всіх тест-культур.

Крім того, було досліджено роль ферментів у запобіганні утворенню біоплівки за концентрації 2 Од/мл. α -Амілаза демонструвала низькі результати за цієї концентрації, в той час як проназа спричиняла деструкцію на 66, 64 і 70% біоплівок *E. coli*, *S. aureus* і MRSA, відповідно. Однак комбінація ферментів показала руйнування біоплівки *E. coli*, *S. aureus* і MRSA всього 44, 51 і 77%.

Комбінація протеази також була досліджена з ПАР синтетичного походження (СТАВ) проти біоплівки *P. fluorescens*. Але якщо у разі використання даного ферменту (32 Ау-А/мг) окремо спостерігали інгібування біоплівки на 25%, то комбінація даних препаратів не давала жодних результатів [10].

Ще одним дослідженим ферментом, що може бути використаний у комбінації з біоцидною речовиною, є β -глюканаза. Хоч даний фермент за концентрацій 5 ВГУ/г і здатний до руйнування біоплівки *P. fluorescens* до 30%, використання його у комбінації з цетилтриметиламонію бромідом (концентрація 35 мг/л) дозволяє збільшити показник руйнування вдвічі [10].

У даному дослідженні також показується використання ферменту ліпази, що не має результату у випадку використання препарату окремо, але в комбінації показник збільшується до 15%.

Дослідження [12] демонструє можливість використання ферменту ДНКазу проти культур *L. monocytogenes* та *E. coli* окремо та у комбінації з антисептичним засобом бензалконієм хлоридом, механізм антимикробної дії якого обумовлений порушенням міжмолекулярних взаємодій. Це може привести до дисоціації біліпідного шару клітинних мембран, що порушує контроль клітинної проникності та викликає витік клітинного вмісту. Щодо *L. monocytogenes* використання комбінації препаратів спостерігається 95% знищення біоплівки, *E. coli* – 41% (концентрація бензалконію хлориду – 16,7 мг/кг для *L. monocytogenes*, 82,1 мг/кг для *E. coli*, концентрація ДНКазу – 400 мкг/мл).

Автори статті [13] порівнювали результати використання комбінації ферментів, включаючи ДНКазу, в комбінації з антибіотиками. Механізм дії меропенему, як і інших β -лактамних антибіотиків, пов'язаний із порушенням синтезу клітинної стінки бактерій, а амікацину - зв'язуючись з 30S субодиницею рибосом, заважає утворенню комплексу транспортної та матричної РНК, блокує синтез білка, а також порушує синтез цитоплазматичної мембрани бактерії. Результати показали, що всі варіанти сумішей трипсин (0,15-0,5 мкг/мл)/ДНКазу І (30-75 од/мл) мали деградаційний вплив на біоплівки *S. aureus* - *P. aeruginosa*, за винятком комбінації 0,15 мкг/мл трипсину та 30 од/мл ДНКазу І. Комбінація ферментативної суміші (0,15 мкг/мл трипсину та 50 ОД/мл ДНКазу І) з антибіотиками дозволила знизити мінімальну концентрацію, що діє на біоплівку як меропенему, так і амікацину в 2,5-5 разів.

Проти *L. monocytogenes* та *E. coli* може бути використана комбінація з ферментом проназою (400 мкг/мл) і бензалконію хлоридом (82,28 мкг/мл та 38,9 мкг/мл відповідно). Дана комбінація дозволяє зруйнувати 100 % мікробної біоплівки кишкової палички та 42% *L. monocytogenes* [12].

Фермент протеїназа К, отримана *Engyodontium album*, також може бути використана у складі антиадгезивної суміші з екстрактами *Brassicaceae* проти біоплівки *E. coli* O157:H7 утвореної на нержавіючій сталі [9]. Інгібування 1 мг/мл екстракту дайкону (*Raphanus sativus* var. *Longi pinnatus*) показав зменшення біоплівки з 7% до 89% (комбінація екстракту з протеїназою К 100

мкг/мл). При тій самій концентрації екстракт дайкону привів до зменшення біоплівки з 17%, а у комбінації з протеїназою К деструкція збільшувалася до 60%. Коли використовували екстракт листової капусти (*Brassica oleracea* var. *acephala*) зменшення біоплівки становило від 41 до 65% при концентраціях від 1 до 4 мг/мл. Біоплівка значно зменшилася з 65 до 98%, коли 4 мг/мл екстракту листової капусти використовували разом з 200 мкг/мл протеїнази К.

Як видно з даних, наведених у *табл. 1.1*, використання антибіоплівкової комбінації, до складу якої входить фермент, дає змогу підвищити ступінь руйнування біоплівок досліджуваних тест культур.

Здатність комплексу ферментів з іншими біоцидними речовинами до деструкції біоплівки

Фермент	Концентрація	Інший біоцид	Концентрація	Тест-культура	Ступінь руйнування біоплівки, %			Література
					Фермент	Інший біоцид	Суміш	
β-глюканаза	5 ВГУ/г	Цетилтриметиламонію бромід	35 мг/л	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	25	60	[10]
α-амілаза	40 СГ				30		60	
Ліпаза					0		15	
Протеаза	32 Аи-А/мг				25		0	
Проназа	400 мкг/мл	Бензалконію хлорид	16-82 мкг/мл	<i>Listeria monocytogenes</i> A1-gfp <i>Escherichia coli</i> A14-chy	-	-	41-95	[12]
ДНКаза			38-82 мкг/мл		-		42-100	
Проназа	5 Од/мл	α-амілаза	400 Од/мл	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	90	40-60	80-95	[11]
Протеїназа К	100-200 мкг/мл	екстракти отримані з дайкону та листової капусти	1-4 мг/мл	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	7-65	60-95	[9]

Примітка: «-» - дані не наведено.

1.1.2 Комбінація кислот з синтетичними антибіотиками

Найбільше досліджень 2014-2020 років, щодо використання комбінації антиадгезивних препаратів з синтетичними антибіотиками, велося за використання ципрофлоксацину - протимікробний засіб з групи фторхінолонів II покоління. Механізм антибактеріальної дії обумовлений здатністю ципрофлоксацину пригнічувати топоізомерази II типу (ДНК-гіразу та топоізомеразу IV), які є необхідними в багатьох процесах життєвого циклу ДНК, таких як реплікація, транскрипція, репарація і рекомбінація .

Встановлено, що цис-2-деценова кислота, синтезована *Pseudomonas aeruginosa*, здатна впливати на біоплівку декількох типів мікроорганізмів, зокрема *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* та *E. coli*, за рахунок своєї здатності виробляти міжвидові сигнали дифузійного фактору, що здатні пригнічувати утворення біоплівок та індукувати їх розсіювання [14]. Абіотичною поверхнею, на якій утворювалась біоплівка були пластинки з нержавіючої сталі. Обробка поверхні як цис-2-децееновою кислотою, так і антибіотиками спричиняла значний вплив на видалення попередньо сформованих біоплівок, утворених досліджуваними мікроорганізмами на полістиролових поверхнях. Наприклад, обробка ципрофлоксацином біоплівок, утворених *S. aureus* і *B. cereus*, спричинила зменшення їх біоплівок приблизно на 11% і 13% відповідно (порівняно з біоплівками без будь-яких обробок) у той час як комбінована обробка їх біоплівок 1 мкг ципрофлоксацину та 310 нМ цис-2-децееновою кислотою призвело до видалення їх біоплівок на 87% і 89% відповідно [15].

Крім того було досліджено вплив цис-2-децеенової кислоти у комбінації з антибіотиками на руйнування комплексної біоплівки *E. coli* + *K. pneumoniae*. Однак найбільше видалення біоплівки спостерігалось, коли обидва типи біоплівок обробляли комбінацією цис-2-децеенової кислоти та ципрофлоксацину, що призвело до 90 % зменшення біомаси біоплівки в одновидових біоплівках і на ~ 80 % видалення біоплівки у двовидових біоплівках [15].

Доведено, що амінокислоти можуть підвищити розчинність малорозчинних препаратів. Дослідження [16] підтвердили це з ципрофлоксацином у комбінації з D-формами глутамінової та аспарагінової кислот. Спочатку дослідники довели, що дані амінокислоти мають активність проти біоплівки золотистого стафілокока і що поєднання обох амінокислот є більш ефективним. Значну синергію в інгібуванні біоплівки показали комбінації 10 мМ D-AA (10мМ D-Glu + 10мМ D-Asp) + 3,75 мкг/мл ципрофлоксацину та 20 мМ D-AA (20мМ D-Glu + 20мМ D-Asp) + 15 мкг/мл ципрофлоксацину, порівно з використанням препаратів окремо за концентрацій D-AA (2,5–40 мМ), ципрофлоксацину (3,75-15 мкг/мл).

Наведена вище інформація дозволяє підтвердити синергічний антиадгезивний ефект використання первинних метаболітів, таких як ферменти та кислоти у поєднанні з іншими біоцидними речовинами щодо патогенних мікроорганізмів.

1.2. Синергічна антиадгезивна властивість вторинних мікробних метаболітів з іншими біоцидами

Мікробні вторинні метаболіти – продукти мікробного синтезу, які не є необхідними для росту і розмноження, що мають певні біологічні властивості. До вторинних метаболітів належить широкий спектр сполук: антибіотики, екзополісахариди, інгібітори ферментів, поверхнево-активні речовини, яким притаманний широкий спектр біологічної активності, зокрема антифунгальна, завдяки чому можуть стати альтернативою відомим антимікробним сполукам у медицині.

У літературі є відомості про роль у руйнуванні біоплівок суміші різних біоцидів з такими вторинними мікробними метаболітами як антибіотики [14-20], бактеріоцини [22,23], поверхнево-активні речовини [24-32].

1.2.1 Суміш антибіотиків з іншими біоцидами

Все частіше постає проблема катетерних інфекцій, для лікування яких запропоновано використовувати комбінацію антибіотиків гентаміцину, ванкоміцину та амікацину, механізм дії яких пов'язаний з інгібуванням

біосинтезу клітинної стінки, у комбінації з ЕДТА чи амінокислотою L- аргініном [17]. При використанні комбінації гентаміцину з ЕДТА всі 18 досліджених клінічних штамів, крім *P. aeruginosa*, показали зниження виживання. Проти *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacteriaceae* та *P. aeruginosa*, гентаміцин + L-аргініновий замок був активним проти майже всіх досліджуваних штамів, за винятком одного штаму *Klebsiella pneumoniae*. Аналогічні результати спостерігалися й за використання ванкоміцину та амікацину у комплексі з ЕДТА.

У дослідженні [18] було виявлено, що лізин значно посилює протигрибкову дію амфотерцину В проти штамів *C. albicans*, хоча сам лізин не має фунгіцидної дії. Комбінація лізину з амікацином В показала значний ефект зниження метаболічної активності біоплівки. Значне пригнічення метаболічної активності біоплівки спостерігалось при поєднанні 0,5 мкг/мл амікацину В з 2 мМ лізину. Коли амікацин В використовували в комбінації з 4 мМ лізину спостерігалось різке зниження метаболічної активності біоплівки. Концентрація 2 мМ лізину в поєднанні з амікацином В призвела до зниження на 65%, а максимальний ефект (зниження до 90%) спостерігався при 4 мМ лізину в комбінації з амікацином В.

Комбінація двох антифунгальних засобів також можлива. Це показано у дослідженнях [19] проти біоплівки *Candida albicans* та *Candida glabrata* окремо та у комплексі. Результати показали, що ефективність інгібування залежала від концентрації каспофунгіну, механізм дії якого заснований на інгібуванні β -глюкану. Щоб ефективно знищити біоплівку *C. albicans* було використано суміш каспофунгіну (0,08 мкг/мл) та флуконазолу (80,25 мкг/мл), значно нижчі результати спостерігались за використання препаратів окремо. Подібні результати були продемонстровані на біоплівці *C. glabrata*, а саме за концентрації каспофунгіну та флуконазолу 0,11 мкг/мл та 10,5 мкг/мл відповідно. На змішану біоплівку найкраще подіяла суміш каспофунгіну у концентрації 0,14 мкг/мл та флуконазолу – 77,25 мкг/мл.

Аналогічні закономірності спостерігались і за використання таких антибіотиків як ванкоміцин та ампіцилін проти грамнегативних та грампозитивних бактерій [14].

За відсутності цис-2-деценової кислоти, ампіцилін викликав лише 21% зменшення біоплівки двох видів *E. coli* + *Klebsiella pneumoniae*, тоді як додавання 310 нМ цис-2-деценової кислоти призвело до 78% видалення біоплівки [15].

У статті [16] було продемонстровано можливість підвищення здатності руйнування біоплівки *P. fluorescens* за використання комбінованої стратегії у вигляді наночастинок золота з антибіотиком стрептоміцином. Встановлено, що кількість клітин, прикріплених до наночастинок золота, зменшилася до 100 разів у порівнянні з необробленим антибіотиком.

Поява штамів *S. aureus*, стійких до поширених антибіотиків, таких як мупіроцин є підставою для розробки альтернативних варіантів лікування для боротьби з інфекційними захворюваннями, зокрема тими, які пов'язані з біоплівками *S. aureus* [21]. Коли 24-годинні біоплівки обробляли комбінацією ізосорбиду мононітрату з мупіроцином, кількість бактерій у біоплівці була значно менша порівняно з одним лише мупіроцином. У порівнянні з необробленим контролем, поєднання 5 мкг/мл мупіроцину з 60 мг/мл ізосорбиду мононітратом показало значне зниження кількості бактерій.

Нізин — поліциклічний антибактеріальний пептид, що виробляється грампозитивними бактеріями виду *Lactococcus lactis*. Хоча загалом більшість бактеріоцинів інгібують лише тісно споріднені види, низин є рідкісним прикладом бактеріоцину широкого спектра дії, ефективного проти багатьох грампозитивних організмів, включаючи молочнокислі бактерії, а також патогени *Listeria monocytogenes*, золотистий стафілокок, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* тощо. Механізм дії нізину заснований на тому, що він вбудовується у внутрішню мембрану, утворюючи іонні канали або пори.

У дослідженні [22] описано вплив нізину, отриманого за допомогою *Lactococcus lactis*, у комбінації з гіалуроновою кислотою на біоплівку

Staphylococcus epidermidis Результати показали, що сам по собі нізим здатний інгібувати 83-94% біоплівки (концентрація 0,1-1 мг/мл), гіалуронова кислота – 95-97%. В свою чергу найвищий результат спостерігався за комбінації гіалуронової кислоти у концентрації 100 мкг/мл та бактеріоцину нізину 1 мг/мл – 99,8%.

Інша комбінація бактеріоцину була описана у статті [23]. У комплексі використовували ефірну олію куркуми та кориці проти біоплівки *S. epidermidis* та *E. coli*. Руйнування біоплівки відбувалося за концентрацій бактеріоцину-GAM217 2,36-9,45 мкг/мл та ефірних олій – 6,25-15,62 мкг/мл, що у 4-30 разів вище порівняно з використанням окремо.

1.2.2 Комплекс мікробних поверхнево-активних речовин з біоцидами

На даний момент немає великої кількості матеріалів щодо комбінованої дії антибіотиків і поверхнево-активних речовин. Відомо, що механізм дії останніх полягає в порушенні цілісності цитоплазматичної мембрани тест-культур і втраті клітиною життєздатності.

У 2021 р. було опубліковано огляд [24], в якому наведено інформацію про використання поверхнево-активних речовин у комбінації з іншими препаратами, задля підвищення ступеня руйнування мікробних біоплівок [25,26].

Наприклад у статті [26] показано можливість використання софороліпиду та каприлової кислоти, у концентрації (0.04 % v/v) та (0.01 % v/v) відповідно, як специфічна стратегія для знищення клітин у біоплівках *P. aeruginosa* ATCC 15442.

Поверхнево-активна речовина, синтезована *Bacillus subtilis* AC7, на середовищі LB, що містить триптон та дріжджовий екстракт, досліджувалась у комбінації з фарнезолом. Попереднє покриття ПАР штаму AC7BS чи фарнезолом (100 мкмоль/л) значно зменшило адгезію (1,5 год) у діапазоні від 38,5% до 42,0%. AC7BS у поєднанні з фарнезолом значно зменшив адгезію трьох штамів *C. albicans* в діапазоні від 72,1% до 75,9% і зростання біоплівки за 24 години в діапазоні від 83,8% до 92,9% [25]

Дослідження [27] спрямовані на те, як рамноліпіди, софороліпіди та тетрациклін взаємодіють з поверхнями бактерій в адсорбованих плівках. Для дослідження було використано скло, попередньо оброблене поліетиленіміном. Бактерії, оброблені тетрацикліном із меншою концентрацією ніж МІК (0,4 мкг/мл), мали схожий вигляд з необробленими, хоча діаметр деяких бактерій був більшим. У тих зразках, де тетрациклін використовувався у концентрації більшій за МІК (0,6 мкг/мл), бактерії зазвичай мали ознаки пошкодження. Після того, як антибіотик і біосурфактанти використовувалися разом, результати були різними. Комбінація софороліпиду та тетрацикліну у концентрації нижче МІК (0,4 мкг/мл), давав більше пошкоджених та зруйнованих бактерій, що вказує на можливість подальшого використання такої комбінації задля запобігання утворенню мікробної біоплівки *S. aureus*. Комбінація з рамноліпідом не дала позитивних результатів.

У статті [28] порівнюється використання комбінації антибіотиків з комбінаціями з залученням поверхнево-активних речовин (рамноліпідів). Результати показують, що використання рамноліпідів у комбінації з антибіотиком амікацином можуть знищити мікробну біоплівку *Helicobacter pylori* на 90%, при чому таких результатів при використанні препаратів окремо не спостерігалось, а саме при дії амікацину у концентрації 122,88 мкг/мл на біоплівку ступінь декструкції становив ~50%, а рамноліпиду у концентрації 1226,6 мкг/мл – 70%. Крім того, було досліджено комбінацію амікацину з кларитроміцином та ПАР. Ступінь декструкції становив 95%, але концентрація останнього з препаратів була в 4 рази вища (49512,2 мкг/мл) ніж за комбінації препаратів, описаній вище.

У випадку дослідження здатності *Helicobacter pylori* до прикріплення після обробки препаратами антибіотиків та поверхнево-активних речовин рамноліпідів, у статті описано здатність останнього підвищувати активність антибіотиків у комбінації. Використання амікацину у концентрації 0,48 мкг/мл та кларитроміцину у концентрації 0,03 мкг/мл може ігнорувати лише 50%. В свою чергу ПАР у концентрації 78,8 мкг/мл – більше 90% *Helicobacter pylori*. Повне

інгібування спостерігається за комбінації рамноліпиду у концентрації 153,6 мкг/мл з кларитроміцином (0,24 мкг/мл) чи амікацином (0,06 мкг/мл).

За результатами експериментів [29] було досліджено поєднання антибіотиків ампіциліну, тобраміцину, цефтриаксону та цефазоліну з поверхнево-активними речовинами *Bacillus licheniformis* V9T14 – ліпопептидами, проти кишкової палички *Escherichia coli* CFN073. ПАР були отримані на середовищі LB, що містить триптон та дріжджовий екстракт. Майже всі антибіотики, крім тобраміцину, істотно збільшували деградацію біоплівки кишкової палички. Наприклад, асоціація ампіциліну та поверхнево-активних речовин значно зменшила біоплівку так само як комбінація з цефазоліном при низькій концентрації (8 мкг/мл) антибіотику.

Поверхнево активні-речовини софороліпіди, синтезовані *Starmarella bombicola* на середовищі що містить висівки, сечовину та бавовняну олію, можуть також бути використані у комбінації з антибіотиками, зокрема у вигляді ніосом, для знищення біоплівки *C. albicans* SC5314 [30]. Результати показали, що через 24 години знищення біоплівки відбулося для амфотерцину В і комплексу препаратів за концентрації 0,390 мкг/мл, при збільшенні годин дії до 48 та 72 год, концентрація препаратів знизилась до 0,195 мкг/мл. У вигляді ніосом SL-AmB концентрація інгібування при 24 год становила 0,195 мкг/мл, а при 48 і 72 год концентрація знищення біоплівки знизилась до 0,048 мкг/мл.

У статті [31] встановлено, що софороліпіди, отримані *Starmarella bombicola* при концентраціях 15 та 30 мкг/мл здатні зменшити інгібуючу концентрацію на біоплівку *C. albicans* амфотерцину В у 4 рази та флуконазолу у 32 рази відповідно.

До використання у комбінації також можуть бути залучені і наночасточки, як у було показано у роботі [32]. Обидві тест культури *Pseudomonas aeruginosa* та *S. aureus* здатні утворювати біоплівку на поверхні скляних пробірок, яка може бути зменшена за рахунок обробки комплексу наночастинок срібла та заліза, оброблених рамноліпідами, отриманими за допомогою *P. aeruginosa* EBN8 на середовищі, що містило олію з ріпака чи соєвих бобів або відходи цих олій. При

додаванні RL-Ag і RL-Fe₃O₄ спостерігалася посилена антиадгезивна/антибіоплівкова активність (наночастинки в концентрації 1 мг/мл, ПАР – 250 мкг/мл). Також було досліджено ігібування біоплівки за обробки препаратами під час її утворення. Після 24 год інкубації *P. aeruginosa* показав максимальне зменшення біоплівки в присутності наночасточок RL-Fe₃O₄ (~88%) порівняно з RL-Ag (84%), за використання лише рамноліпиду значення було - 58%. Аналогічні результати спостерігались і для *S. aureus*.

У табл. 1.2 наведено ефективні синергічні комбінації біоцидів, до складу яких входять вторинні мікробні метаболіти (антибіотики, бактеріоцини, ПАР).

Отже, наведена вище інформація підтверджує можливість використання суміші з вторинними метаболітами, задля підвищення антиадгезивної активності та ступінь руйнування біоплівок досліджуваних тест-культур.

Таблиця 1.2

Вплив комбінацій вторинних метаболітів з іншими біоцидами на руйнування біоплівки

Вторинний метаболіт	Концентрація	Інший біоцид	Концентрація	Тест-культура	Ступінь руйнування біоплівки, %			Література
					Метаболіт	Біоцид	Суміш	
Ампіцилін	256 мкг/мл	Цис-2-деценінова кислота	310 нМ	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21	-	78	[15]
Нізін	0,1-1 мг/мл	Гіалуронова кислота	100 мкг/мл	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	83-94	9-97	100	[22]
ПАР, отримані з <i>Bacillus subtilis</i> АС7	0,1-2 мг/мл	Фарнезол	100 мкмоль/л	<i>Candida albicans</i>	38-42	39-42	84-93	[25]
Рамноліпіди	49512,2 мкг/мл	Амікацин Кларитроміцин	122,8 мкг/мл	<i>Helicobacter pylori</i>	70	50	95	[28]
	250 мкг/мл	Наночасточки срібла чи заліза	1 мкг/мл	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	58	-	88	[32]

Примітка: «-» - дані не наведено

РОЗДІЛ 2. СИНЕРГІЗМ АНТИАДГЕЗИВНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОБНИХ МЕТАБОЛІТІВ ПРОТИ БАГАТОВИДОВИХ БІОПЛІВОК

Біоплівки зазвичай визначаються як складні системи, що містять консорціуми бактерій та/або грибів, прикріплених до біотичних або абіотичних поверхонь і розміщених у тривимірній позаклітинній полімерній матриці (ЕРМ), що складається в основному з секретованих полісахаридів і білків. *Pseudomonas aeruginosa* і *Candida* spp. є одними з найпоширеніших патогенів, що утворюють біоплівки, і їх біоплівки вважаються фактором ризику бактеріємії/кандидемії, сприяючи збільшенню рівня смертності

Candida albicans є основним грибковим збудником людини, що викликає різноманітні інфекції. Умовно- патогенні дріжджі *C. albicans* можуть утворювати біоплівки на біотичних і абіотичних поверхнях, включаючи імплантовані медичні пристрої. Ці біоплівки також часто мають полімікробну природу, містять інші гриби, бактерії чи віруси. Близькість усіх цих організмів у біоплівці дозволяє взаємодіяти фізичними засобами, а також через секретовані сполуки, такі як молекули, окисно-відновні активні сполуки та біоактивні ліпіди. Крім того, доступність поживних речовин і конкуренція за них відіграють важливу роль у взаємодії, яку часто описують як синергетичну.

Для вивчення взаємодії між *C. albicans* і бактеріями використовуються різні моделі біоплівок. Однією з них, яка є майже синонімом біоплівки, є ротова порожнина, іншим контекстом, є ранові інфекції. *C. albicans* і *P. aeruginosa* також були широко вивчені в контексті муковісцидозу легень [33].

Ця робота [34] мала на меті оцінити активність моно- та комбінованої протимікробної терапії з використанням одного антибіотика (Поліміксин В; PolyВ) та одного протигрибкового засобу (Амфотерицин В; AmВ) проти полімікробних біоплівок *P. aeruginosa* та *C. albicans*.

				НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ			
		№	П				
Розроб.	Жалюк Д.В.			РОЗДІЛ 2. СИНЕРГІЗМ АНТИАДГЕЗИВНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОБНИХ МЕТАБОЛІТІВ ПРОТИ БАГАТОВИДОВИХ БІОПЛІВОК	Л	А	Акруші
Перевірив	Пирог Т.П.				79	26	
Конс					Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.						

Дія ізольованих протимікробних препаратів спочатку була оцінена в моно- та полімікробних культурах, причому AmB був більш ефективним проти *C. albicans* і PolyB проти *P. aeruginosa*. Змішані планктонні культури вимагали однакових або вищих концентрацій протимікробних засобів. У біоплівках тільки PolyB у відносно високих концентраціях може зменшити *P. aeruginosa* як у моновидових, так і в полімікробних популяціях, з *C. albicans* демонструє лише пунктуальні порушення. PolyB і AmB продемонстрували синергетичний ефект проти *P. aeruginosa* і *C. albicans* змішаних планктонних культур, але лише високі дози Поліміксину В (256 мг/л) змогли знищити полімікробні біоплівки, з *P. aeruginosa* демонструє втрату здатності до культивування (але не життєздатності) через 2 години після обробки, тоді як *C. albicans* почала пригнічуватися лише через 14 год. Підсумовуючи, комбінована терапія, що включає антибіотик і протигрибковий засіб, є привабливим терапевтичним варіантом для лікування важких бактеріально-грибкових полімікробних інфекцій. Тим не менш, оптимізація доз протимікробних препаратів і подальші дослідження клінічної фармакокінетики/фармакодинаміки та токсикодинаміки, що підтримують оптимальне використання цих препаратів, терміново необхідні для підвищення ефективності терапії та уникнення повторного зараження.

Діабетичні виразки стопи (ДСН) є тягарем охорони здоров'я, що зростає, і спричиняють надмірну захворюваність і смертність пацієнтів. Відомо, що інфекція погіршує загоєння та пов'язана з рецидивом виразок. Причиною даної інфекцій є в основному бактерії *P. aeruginosa* PA14 і *S. aureus* ATCC 13420 і дріжджі *C. albicans* SC5314.

У роботі [35] було запропоновано використання комбінації 3 лікарських речовин (антибіотики флуклоксацилін (FLX) і ципрофлоксацин (CIPX) і протигрибковий флуконазол (FLC)) проти бактерії *Pseudomonas aeruginosa* PA14 і *Staphylococcus aureus* ATCC 13420 і дріжджі *Candida albicans* SC5314. В результаті було доведено, що комбінація всіх трьох препаратів була потрібна для інгібування всіх трьох мікроорганізмів у біоплівці.

Концентрація 128 мг/л мало впливала на життєздатні клітини всередині матиці, хоча загальну композицію була порушено. Це означає, що усунення одного мікробного компонента біоплівки за допомогою цільової терапії створює нішу для процвітання інших видів.

Анідулафунгін і тайгециклін активні проти біоплівок одного і двох видів *C. albicans* і *S. aureus* *in vitro* відповідно. При додаванні до 24-годинних біоплівок анідулафунгін значно зменшував кількість клітин *C. albicans* як у моделях одного виду, так і в моделях змішаних видів (для концентрацій $\geq 1-2$ мг/л), але не мав жодної активності проти одного та подвійного виду *S. aureus*. Тайгециклін не виявляв активності на *C. albicans* навіть у найвищій протестованій концентрації (16 мг/л). Проте клітини *S. aureus* у біоплівках одного та змішаного виду були чутливі до низьких концентрацій ($< 0,5$ мг/л) тайгецикліну. Разом ці дані демонструють активність анідулафунгіну та тайгецикліну на клітини *in vitro* *C. albicans* і *S. aureus* у моно- та двовидових біоплівках відповідно [36].

У цьому дослідженні [37] оцінювали 2-амінобензімідазол (2ABI) і куркумін (CUR) окремо для інгібування росту планктонних клітин, адгезії, а також біоплівок окремих і змішаних видів *C. albicans* та *S. aureus* на силіконі. Було оцінено комбінований вплив 2ABI і CUR на формування біоплівки змішаних видів і попередньо сформованої біоплівки. Робота показала, що 2ABI або CUR поодиноці ефективні як єдиний агент, пригнічуючи ріст планктону, адгезію та утворення біоплівки бактерій і дріжджів на поверхні силікону. Комбінація 2ABI і CUR показала посилений ефект на змішану біоплівку порівняно з терапією монопрепаратом. Комбінована активність була найпотужнішою на змішаній біоплівці. Ці результати свідчать про потенційну застосовність 2ABI і CUR для лікування інфекцій пристроїв, пов'язаних з біоплівкою.

Для кількісної оцінки ефекту 2ABI або CUR окремо та комбінованих ефектів 2ABI та CUR на сформовану біоплівку було використано найвищу концентрацію 2ABI або CUR (200 мкг/мл). Комбінація 2ABI і CUR зменшила

кількість зрілих біоплівки *S. aureus*, *C. albicans* і змішаних видів на 47,7%, 90,6% і 73,3% , які є більш ефективними. ніж 2AB1 або CUR окремо.

Дані [38] показали, що полімікробні біоплівки, утворені взаємодією дріжджі-бактерія, інгібувалися протимікробними препаратами каспофунгін (CAS), мікафунгін (MFG) і поліміксим В (PMB) при значеннях $MBIC_{50} \geq$ значеннях $MBIC_{50}$ для мономікробних біоплівок. PMB був ефективним проти полімікробних біоплівок *P. aeruginosa* з *C. tropicalis* ($MBIC_{50} \leq 2$ мкг/мл), *C. parapsilosis* ($MBIC_{50} = 4-16$ мкг/мл), *C. glabrata* ($MBIC_{50} = 8-16$ мкг /мл), або *C. albicans* ($MBIC_{50} = 8-64$ мкг/мл). Обидва ехінокандіни (CAS, $4 \geq 128$ мкг/мл; MFG, $8 \geq 128$ мкг/мл) зменшили загальну біомасу полімікробних біоплівок, особливо тих, що утворюються *Candida* spp. І штамп *P. aeruginosa* 151, які були інгібовані при найнижчих значеннях $MBIC$. Комбіноване використання цих сполук значно пригнічувало розвиток змішаної бактеріально-грибкової біоплівки.

У статті [39] перевіряли вплив препаратів, що мають різноманітну антимікробну та антибіоплівкову ефективність проти *C. albicans* і *Streptococcus mutans*. Серед 16 перевірених композицій три повністю пригнічували ріст обох видів: C135 (4'-гідроксихалкони)+ *tt* -фарнезол+мірицетин, C135+ *tt* -фарнезол+фторид і C135+ *tt* -фарнезол+1771 (інгібітор ліпотейхоєвої синтази в грампозитивних бактеріях)+мірицетин+фторид (усі сполуки в поєднанні з фтором). Крім того, враховуючи загальне пригнічення росту бактерій в умовах двох видів, ефективними були чотири складі (C135+ *tt* -фарнезол+1771+мірицетин, C135+фторид, C135+1771+фторид і C135+мірицетин+фторид). Враховуючи загальне пригнічення росту грибів у двох видах, ефективними були чотири обробки (C135, C135+ *tt* -фарнезол, C135+1771 і C135+мірицетин). Крім того, деякі препарати знижували щонайменше 50% КУО/мл (порівняно з носієм) *S. mutans*(C135+ *tt* -фарнезол, C135+ *tt* -фарнезол+1771), або *C. albicans* (C135+ *tt* -фарнезол+1771+мірицетин і C135+мірицетин+фторид).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Об'єкти досліджень

Об'єктом досліджень є штам *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України.

Як тест-культури для визначення антиадгезивної активності використовували штами бактерій *Pseudomonas sp* МІ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Proteus vulgaris* БТ-1, *Candida albicans* D-6 з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

У роботі використовували антибіотики ципрофлоксацин та офлоксацин – антибактеріальні препарати з групи фторхінолонів II покоління.

3.2 Культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017

Rhodococcus erythropolis ІМВ Ас-5017 культивували у рідкому поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 1,3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001. Як субстрат використовували відходи від виробництва біодизелю (5%) та очищений гліцерин (3%). Концентрації субстратів еквімолярні за вуглецем.

Як посівний матеріал використовували культуру з середини експоненційної фази росту, вирощену у середовищі наведеного вище складу, що містило 0,5 % відповідного субстрату. Кількість інокуляту з титром 10^4 – 10^5 клітин/мл становила 5 % від об'єму середовища.

Культивування здійснювали у 750 мл колбах зі 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 168 год.

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ			
		№	П					
Розроб.	Жалюк Д.В.			ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	Л	А	Акруші	
Перевірив	Пирог Т.П.					79	30	
Конс					Кафедра БТМ			
Затверд.	Стабніков В.П.							

3.3 Визначення концентрації поверхнево-активних речовин

Кількість позаклітинних ПАР визначали, використовуючи модифікований нами метод Блай і Дайера після екстракції їх сумішню Фолча (хлороформу і метанолу (2:1)) з супернатанту культуральної рідини. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g протягом 20 хв.

Спочатку додавали 5 мл 1М HCl і струшували протягом 5 хв, далі одразу додавали 20 мл модифікованої суміші Фолча (16 мл реактиву Фолча + 4 мл 1М HCl) і знову струшували протягом 5 хв.

Отриману після екстракції суміш залишали в ділильній воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази знову додавали 25 мл модифікованої суміші Фолча (але вже одразу 16 мл реактиву Фолча + 9 мл 1М HCl) і екстрагували струшуючи впродовж 5 хв. Після розділення фаз зливали нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. Екстракцію повторювали ще раз, за допомогою звичайної суміші Фолча (хлороформ : метанол = 2:1), і отримували органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднували і упарювали на роторному випарнику IP1-M2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

3.4 Дослідження антиадгезивної дії препаратів

Для дослідження антиадгезивних властивостей очищені пластинки досліджуваних матеріалів (кахель, сталь) однакового розміру (1 см²) стерилізували при 112 °С впродовж 40 хв. Однодобові тест-культури бактерій, суспендували у 100 мл стерильної водопровідної води. У суспензію вносили попередньо оброблені і необроблені (контроль) препаратами ПАР, антибіотика чи їх суміші (для дослідження синергізму - у відношенні 1:1) матеріали, витримували у термостаті впродовж 2 годин при температурі 30 °С після чого ополіскували 10 мл стерильної водопровідної води для видалення неприкріплених клітин.

Далі визначали ступінь адгезії клітин за допомогою спектрофотометричного методу.

Пластинки матеріалів обробляли метанолом (99%) протягом 15 хв для фіксації адгезованих клітин і висушували при кімнатній температурі, після чого поміщали в 1% розчин генціанвіолета на 5 хв і ополіскували водопровідною водою. Після висушування матеріали обробляли 10 мл 33% розчину оцтової кислоти і вимірювали оптичну щільність отриманої суспензії клітин. Оптичну густину суспензій вимірювали на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм. Кількість (%) адгезованих клітин (адгезія) визначали як відношення оптичної щільності суспензії, отриманої з оброблених препаратами ПАР, антибіотиків чи їх суміші 1-2 зразків до оптичної щільності контрольних зразків (100%).

3.5 Дослідження здатності препаратів до руйнування мікробних біоплівок

Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл м'ясо-пептонного бульйону та 20 мкл суспензії однодобової тест-культури, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культури температурі, після чого зливали культуральну рідину і вносили 180 мкл свіжого МПБ і 20 мкл суспензії тест-культури і ще інкубували впродовж наступних 24 год. Через 48 год культуральну рідину зливали, а в лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культури) вносили по 200 мкл препаратів різної концентрації. Для дослідження синергізму використовувати препарати ПАР та антибіотику у відношенні 1:1.

У контрольні варіанти (лунки) замість препаратів вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води і визначали кількість адгезованих клітин спектрофотометричним методом.

Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених препаратами ПАР, антибіотиків чи їх суміші лунках полістиролового планшета.

Усі досліді проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних

здійснювали за Лакінім. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

3.6 Модифікація методу визначення ступеня руйнування двовидових біоплівок

В навколишньому середовищі мікроорганізми існують у вигляді мікробних біоплівок. Більшість з яких мультिवидові.

Тому визначення дієвості антиадгезивних речовин доцільно визначати не на монокультурах, а на дво- та багатовидових біоплівках тест-культур.

Аналізуючи літературу [40-43], були модифіковані методи, що використовувалися для попередніх досліджень, описаних раніше, де використовувались біоплівки, що складались з однієї тест-культури бактерій.

У вітчизняній літературі перевагу визначення руйнування біоплівки віддавали на чашках Петрі. Даний варіант за рахунок своєї великої площі визначення займає більше часу, ніж у випадку використання лунок полістиролового планшету.

Під час вибору поживного середовища перевагу надано м'ясо-пептонному бульйону для дослідження двовидових біоплівок та суміші м'ясо-пептонного бульйону та рідкого суслу, у випадку використання бактерій в комплексі з дріжджами. У статті [42,43] використовується триптон-соєвий бульйон з додаванням глюкози. Хоча даний субстрат і є можливими варіантом культивування плівки, він є дорого вартісним по своєму складі.

Всі опрацьовані методики розпочиналися з отримання біоплівки, і подальшу обробку попередньо утвореної біоплівки антиадгезивними препаратами.

Визначення ступеня руйнування утвореної біоплівки дво- та багатовидових культур здійснюється спектрофотометрично. Як барвник використовують генціан віолет.

Модифіковані методики наведені нижче.

3.6.1 Метод визначення ступеня руйнування двовидової біоплівки, що складається з двох бактерій

Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл м'ясо-пептонного бульйону та 20 мкл суспензії суміші однодобових тест-культур бактерій, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культур температурі, після чого зливали культуральну рідину і вносили 180 мкл свіжого МПБ і 20 мкл суспензії суміші тест-культур і ще інкубували впродовж наступних 24 год. Через 48 год культуральну рідину зливали, лунки тричі промивали від планктонних (неприкріплених) клітин стерильним фосфатним буфером та висушували їх.

В лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культур) вносили по 200 мкл препаратів ПАР, АБ та їх суміші різної концентрації (3,9-500 мкг/мл).

У контрольні варіанти (лунки) замість препаратів вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл стерильним фосфатним буфером. Лунки мікропланшета висушували, та фіксували протягом 10 хв 96 ° спиртом етиловим та фарбували 1 % розчином кристалічного фіолетового. Потім ще раз промивали фосфатним буфером, далі висушували та додавали 33% розчин оцтової кислоти і визначали оптичну густину за довжини хвилі за спектрофотометрії – 540 нм.

Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5.

3.6.2. Метод визначення ступеня руйнування двовидової біоплівки, що складається з бактерії та дріжджів

Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл (90 мкг сусла та 90 мкг м'ясо-пептонного бульйону) та 20 мкл суспензії суміші однодобових тест-культур бактерій та дріжджів, інкубували упродовж 24

год при оптимальній для тест-культур температурі, після чого зливали культуральну рідину і вносили 180 мкл свіжого МПБ і 20 мкл суспензії суміші тест-культур і ще інкубували впродовж наступних 24 год. Через 48 год культуральну рідину зливали, лунки тричі промивали від планктонних (неприкріплених) клітин стерильним фосфатним буфером та висушували їх.

В лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культур) вносили по 200 мкл препаратів ПАР, АБ та їх суміші різної концентрації (3,9-500 мкг/мл).

У контрольні варіанти (лунки) замість препаратів вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл стерильним фосфатним буфером. Лунки мікропланшета висушували, та фіксували протягом 10 хв 96 ° спиртом етиловим та фарбували 0,1 % розчином кристалічного фіолетового. Потім ще раз промивали фосфатним буфером, далі висушували та додавали 33% розчин оцтової кислоти і визначали оптичну густину за довжини хвилі за спектрофотометрії – 540 нм.

Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

Усі досліді проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5.

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 ТА АНТИБІОТИКІВ НА АДГЕЗІЮ БАКТЕРІЙ ДО АБІОТИЧНИХ ПОВЕРХОНЬ ТА ДЕСТРУКЦІЮ БІОПЛІВОК

Вибір субстратів для біоситнезу ПАР був зумовлений такими причинами.

По-перше, за даними [44] в Україні побудовано 14 біодизельних заводів загальною потужністю 300 тис. т/рік. Крім того, є близько 50 менших підприємств, здатних виробляти до 25 тис. т біодизелю на рік. Зважаючи на сьогоденну ситуацію популярність створення власного екологічно палива буде тільки зростати, разом з чим і росте кількість відходів від виробництва, які потрібно утилізувати.

Було підраховано, що на кожні 100 кг біодизеля виробляється 10 кг відходів, що можуть містити різноманітні домішки, такі як метанол, солі, мило, важкі метали та залишкові жирні кислоти. Це робить відходи, отримані з біодизеля, невідповідним для подальшого очищення [45].

Також перевагою використання даних субстратів є екологічність, зумовлена переробкою нераціональних викидів відходів у навколишнє середовище.

Антибіотикорезистентність основних збудників інфекційних захворювань є однією з найбільших проблем сучасної медицини, що спрямовує на пошук нових методів та препаратів, що здатні впливати та знищувати мікробну біоплівку основних збудників інфекційних захворювань *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* не викликаючи резистентності. [2]

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ		
		№	П				
Розроб.	Жалюк Д.В.			РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ІМВ FC-5017 ТА АНТИБІОТИКІВ НА АДГЕЗІЮ БАКТЕРІЙ ДО АБІОТИЧНИХ ПОВЕРХОНЬ ТА ДЕСТРУКЦІЮ БІОПЛІВОК	Л	А	Акруші
Перевірив	Пирог Т.П.					79	36
Конс					Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.						

4.1. Антиадгезивна активність комплексу поверхнево-активних речовин з антибіотиками щодо бактеріальних тест-культур

4.1.1 *Proteus vulgaris* БТ-1

Експерименти показали вплив препаратів на прикріплення до абіотичних (сталь та кафель) поверхонь тест-культури.

Дані *таблиці 4.1* демонструють прикріплення тест-культури до кафелю. Використання антибіотику ципрофлоксацину зменшило прикріплення *P. vulgaris* БТ-1 до 45-55 % за концентрації 15-30 мкг/мл. Інший антибіотик аналогічні результати (55% прикріплення) показав, за дещо вищої концентрації – 60 мкг/мл. У разі використання поверхнево-активних речовин, отриманих на очищеному гліцерині, за концентрації 30 мкг/мл, спостерігались схожі результати ступеня адгезії – 50%. Суміші даних препаратів показали кращі результати, а саме при використанні комбінації офлоксацину та ПАР, значення адгезії були в межах 36-42% за концентрації препаратів 7,5-30 мкг/мл. Дещо вищі результати спостерігалися при дії суміші ципрофлоксацину та ПАР у концентрації 7,5-15 мкг/мл – 48-50%. При використанні ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизелю, показники адгезії становили 57-64% за концентрації препаратів 7,5-15 мкг/мл, що вище ніж у разі комбінації офлоксацину чи ципрофлоксацину та ПАР за концентрації 15-30 мкг/мл – 36-46%.

Вплив препаратів на прикріплення *Proteus vulgaris* БТ-1 до кахелю за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація препаратів, мкг/мл	Адгезія (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлораксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлораксацину і ПАР
Очищений гліцерин	60	55	68	68	48	86
	30	67	45	50	41	77
	15	63	55	67	36	48
	7,5	55	59	71	42	50
	3,8	73	60	86	56	48
Відходи виробництва біодизелю	60	55	68	86	86	43
	30	67	45	73	45	45
	15	63	55	57	46	39
	7,5	55	59	64	63	55
	3,8	73	60	58	73	61

Аналогічні закономірності спостерігалися і у випадку дослідження прикріплення до сталі (таблиці 4.2). Використання суміші ципрофлораксацину та ПАР та окремо препарату ПАР демонструвало 42% ступеня адгезії за концентрації 30 мкг/мл.

Вплив препаратів на прикріплення *Proteus vulgaris* БТ-1 до сталі за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація препаратів, мкг/мл	Адгезія (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлоксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлоксацину і ПАР
Очищений гліцерин	60	92	65	38	47	65
	30	85	58	42	50	42
	15	58	50	54	62	81
	7,5	53	54	65	62	58
	3,8	42	46	23	77	31
Відходи виробництва біодизелю	60	92	65	43	73	65
	30	85	58	46	69	54
	15	58	50	53	54	51
	7,5	53	54	58	52	62
	3,8	42	46	49	42	72

4.1.2. *Pseudomonas* sp. МІ-2

Результати отримані за дослідження прикріплення *Pseudomonas* sp. МІ-2 до абіотичних поверхонь зображені у таблиці 4.3 та 4.4.

Використання суміші препаратів ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, та антибіотиків дозволило досягти 48-50 % прикріплення за використання офлоксацину та 33-40% для ципрофлоксацину (концентрація 30-60 мкг/мл). Дещо вищі результати були за використання монопрепаратів офлоксацину та ПАР у концентрації 3,8 та 7,5 мкг/мл - 50-63%.

Дещо інші результати у разі використанні ПАР, отриманих на субстраті відход від виробництва біодизелю. Найкращі результати суміші були за найнижчих досліджуваних концентрацій 3,8 та 7,5 мкг/мл, а саме 40-60 % прикріплення. В свою чергу використання лише офлоксацину проти прикріплення за концентрації 30-60 мкг/ мл демонструвало результат 45-53%.

Вплив препаратів на прикріплення *Pseudomonas sp. MI-2* до кафелю за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація препаратів, мкг/мл	Адгезія (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлоксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлоксацину і ПАР
Очищений гліцерин	60	53	30	40	50	33
	30	45	45	48	48	40
	15	38	43	40	43	30
	7,5	50	33	58	35	25
	3,8	60	28	63	18	30
Відходи виробництва біодизелю	60	53	30	45	38	28
	30	45	45	33	40	38
	15	38	43	40	46	28
	7,5	50	33	50	50	48
	3,8	60	28	48	40	60

Вплив препаратів на прикріплення *Pseudomonas sp. MI-2* до сталі мав дещо вищі результати, а саме одночасне використання препаратів ПАР та офлоксацину дало змогу знизити адгезію клітин на 66-75 % (ПАР, отримані на відходах від виробництва біодизелю) за концентрації 7,5-30 мкг/мл та 43-65 % (ПАР, отримані на очищеному гліцерині) за концентрації 15-60 мкг/мл.

Окреме використання кожного з препаратів знизило адгезію *Pseudomonas sp. MI-2* більш ніж на 43% у всьому діапазоні концентрацій (3,8-60 мкг/мл) .

**Вплив препаратів на прикріплення *Pseudomonas sp.* МІ-2 до сталі за дії
ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші**

Субстрат для біосинтезу	Концен- трація препа- ратів, мкг/мл	Адгезія (%) за дії				
		офлокса- цину	ципрофлок- сацину	ПАР	суміші офлокса- цину і ПАР	суміші ципро- флорсацину і ПАР
Очищений гліцерин	60	68	43	79	65	57
	30	36	54	50	43	68
	15	46	64	43	53	43
	7,5	51	68	69	50	54
	3,8	43	71	64	46	63
Відходи виробництва біодизелю	60	68	43	46	39	43
	30	36	54	61	71	59
	15	46	64	43	66	57
	7,5	51	68	54	75	61
	3,8	43	71	68	54	57

4.1.3. *Enterobacter cloacae* C-8

Аналогічні результати отримані і при використанні як тест-культури *E. cloacae* C-8.

Дані прикріплення до кафелю показують (таблиця 4.5), що використання сумішей препаратів значно знизило прикріплення клітин на 50-57 % для ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, та офлоксацину (концентрація 30-60 мкг/мл), на 51-57 % для суміші цієї ж ПАР з ципрофлорсацином за аналогічних концентрацій. При цьому використання проти прикріплення лише однієї абіотичної речовини за таких ж концентрацій демонстрували значно нищі результати – офлоксацин 25-34%, ципрофлорсацин 21-28%, ПАР 11-17%.

Схожі результати і при використанні ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизелю. У випадку використання у суміші з офлоксацином

ступінь запобігання прикріплення становив 57-75% за концентрації 7,5-15 мкг/мл, а з ципрофлоксацином – 43-79 % за концентрації 15-30 мкг/мл.

Таблиця 4.5

Вплив препаратів на прикріплення *Enterobacter cloacae* C-8 до кафелю за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація препаратів, мкг/мл	Адгезія (%) за дії				
		офлокса-цину	ципрофлок-сацину	ПАР	суміші офлокса-цину і ПАР	суміші ципро-флорсацину і ПАР
Очищений гліцерин	60	25	21	11	57	51
	30	34	28	17	50	57
	15	54	14	27	39	54
	7,5	68	13	32	29	32
	3,8	35	15	18	25	29
Відходи виробництва біодизелю	60	25	21	50	32	32
	30	34	28	41	52	43
	15	54	14	28	75	79
	7,5	68	13	25	57	25
	3,8	35	15	14	46	29

За одночасного використання суміші ципрофлоксацину та ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, вдалося підвищити запобігання прикріплення на 50-63 % (концентрація 3,8-7,5 мкг/мл), при чому самостійне використання препаратів значно нижчі результати за таких концентрацій: ципрофлоксацин 25-31%, ПАР – 26-31%.

Значно зменшилось прикріплення і до сталі, за використання суміші офлосацину та ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизел. Так за

концентрації 7,5-15 мкг/мл суміш запобігала прикріпленню на 57-75 %, а монопрепарати на 15-17% для ПАР та 48-54% для офлоксацину.

Таблиця 4.6

Вплив препаратів на прикріплення *Enterobacter cloacae* C-8 до сталі за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація препаратів, мкг/мл	Адгезія (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлор-сацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлорсацину і ПАР
Очищений гліцерин	60	25	29	46	57	31
	30	64	60	37	50	38
	15	54	58	34	49	33
	7,5	48	31	31	39	63
	3,8	25	25	26	25	50
Відходи виробництва біодизелю	60	25	29	38	32	73
	30	64	60	21	42	31
	15	54	58	17	75	21
	7,5	48	31	15	57	21
	3,8	25	25	16	46	40

4.2. Руйнування біоплівки тест-культур за дії комплексу поверхнево-активних речовин з антибіотиками

4.2.1 *Proteus vulgaris* БТ-1

Таблиця 2.7 демонструє ступінь руйнування біоплівки *P. vulgaris* БТ-1 за дії антимікробних сполук. Результати показують, що за дії монопрепаратів - ПАР (у концентрації 15,6-125 мкг/мл), офлоксацину (у концентрації 62,5-125 мкг/мл) та ципрофлорсацину (у концентрації 7,8-31,3 мкг/мл) відсоток досягав 70-77%. Аналогічні результати і у випадку використання суміші препаратів ПАР та антибіотиків (концентрація 7,8-250 мкг/мл).

Таблиця 4.7

Вплив препаратів на руйнування біоплівки *Proteus vulgaris* БТ-1 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концен- трація препа- ратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлокса- цину	ципрофлок- сацину	ПАР	суміші офлокса- цину і ПАР	суміші ципро- флорсацину і ПАР
Очищений гліцерин	500	2	14	14	30	23
	250	60	63	72	63	60
	125	70	74	67	65	72
	62,5	74	67	63	74	67
	31,2	51	77	77	79	72
	15,6	42	74	74	72	74
	7,8	23	77	53	74	63
	3,9	5	44	4	7	7
Відходи виробництва біодизелю	500	2	14	12	14	19
	250	60	63	65	70	63
	125	70	74	77	70	79
	62,5	74	67	74	65	72
	31,2	51	77	72	67	74
	15,6	42	74	63	63	67
	7,8	23	77	37	56	70
	3,9	5	44	40	12	7

4.2.2. *Pseudomonas* sp. МІ-2

У таблиці 4.8 зображено результати здатності досліджуваних препаратів до руйнування біоплівки *P. sp.* МІ-2. Результати демонструють, що у випадку використання препаратів окремо чи у суміші з ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, за концентрації 62,5-125 мкг/мл ступінь руйнування біоплівки становив 72-79 %. Трішки вищі результати 79-83% руйнування у випадку використання ципрофлоксацину з даним ПАР за концентрації 7,5-31,2 мкг/мл.

Ступінь руйнування біоплівки був на рівні ~70% у разі використання офлоксацину у конентрації 62,5-125 мкг/мл, ципрофлоксацину 7,8-15,6 мкг/мл та 62,5-125 мкг/мл, ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизелю 31,2 мкг/мл, суміші офлоксацину з ПАР 125-250 мкг/мл та ципрофлоксацину з ПАР 31,2-62,5 мкг/мл. Найвищі показники руйнування були за використання суміші ПАР з антибіотиками за концентрації 62,5 мкг/мл і становили 81-84 %.

**Вплив препаратів на руйнування біоплівки *Pseudomonas sp.* МІ-2 за дії
ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші**

Субстрат для біосинтезу	Концен- трація препа- ратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлокса- цину	ципрофлок- сацину	ПАР	суміші офлокса- цину і ПАР	суміші ципро- флоксацину і ПАР
Очищений гліцерин	500	49	40	28	25	23
	250	61	41	60	67	49
	125	72	75	72	79	79
	62,5	73	77	77	72	76
	31,2	65	67	63	67	83
	15,6	62	74	65	61	80
	7,8	57	73	60	51	79
	3,9	40	61	32	33	36
Відходи виробництва біодизелю	500	49	40	44	20	19
	250	61	41	59	71	60
	125	72	75	41	74	69
	62,5	73	77	61	84	81
	31,2	65	67	72	63	70
	15,6	62	74	51	53	68
	7,8	57	73	41	51	64
	3,9	40	61	25	49	57

4.2.3. *Enterobacter cloacae* C-8

Вплив препаратів на руйнування біоплівки *E. cloacae* C-8 показаний у таблиці 4.9. Майже повне руйнування біоплівки 92-96% відбувалося за використання 92-96 % у разі використання офлоксацину у концентрації 62,5-125 мкг/мл, ципрофлоксацину – 7,8-15,6 мкг/мл, ПАР, отриманих на очищеному

гліцерині, - 15,6-31,2 мкг/мл. Деяко нижчі результати 78-88% у разі використання суміші офлоксацину чи ципрофлоксацину та ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, у концентрації 31,2-125 мкг/мл. Суміш ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизелю, та антибіотиків ципрофлоксацину та офлоксацину здатна руйнувати біоплівку на 79-82 % за концентрація 31,2-62,5 мкг/мл та 63-88 % за аналогічної концентрації відповідно.

Таблиця 4.9

Вплив препаратів на руйнування біоплівки *Enterobacter cloacae* С-8 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація препаратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлоксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлоксацину і ПАР
Очищений гліцерин	500	47	34	33	54	38
	250	54	75	75	58	46
	125	92	73	83	63	79
	62,5	96	79	96	88	88
	31,2	71	83	94	79	88
	15,6	54	95	92	76	78
	7,8	46	92	88	70	62
	3,9	28	67	63	67	54
Відходи виробництва біодизелю	500	47	34	79	44	33
	250	54	75	58	69	43
	125	92	73	83	76	46
	62,5	96	79	88	79	88
	31,2	71	83	75	82	63
	15,6	54	95	63	72	58
	7,8	46	92	75	69	52
	3,9	28	67	46	38	25

В закордонній літературі досить небагато згадок про дію комплексів препаратів на мікробну біоплівку. Giri та ін. [46] досліджували потенціал антибіоплівкової активності суміші ліпопептидів, що продукуються *B. subtilis* VSG4 та *B. licheniformis* VS16 проти *S. aureus*, *S. typhimurium* та *B. cereus*. Попередня обробка планшетів сумішшю поверхнево-активними речовинами значно інгібувала утворення біоплівки та сприяла знищенню біоплівки з відсотком зменшення при найвищій досліджуваній концентрації (5 мг/мл) 65–82% та 61–76% відповідно.

Elshikh та ін., дослідили вплив різних типів рамноліпідів і софороліпідів проти деяких бактеріальних патогенів, таких як *S. oralis*, *A. naeslundii*, *N. mucosa* і *S. sanguinis* [47,48]. Комплекс ПАР суттєво інгібували утворення біоплівки в цих штаммах у діапазоні 60–90 %, порівняно з використанням даних поверхнево-активних речовин окремо.

Також прикладом є використання комбінації антибіотику амікацину з рамноліпідами проти мікробної біоплівки *Helicobacter pylori*, що здатна зруйнувати її на 90%. Важливо зауважити, що при використанні препаратів окремо, таких результатів не спостерігалось. Повне інгібування спостерігається за комбінації рамноліпиду у концентрації 153,6 мкг/мл з кларитроміцином (0,24 мкг/мл) чи амікацином (0,06 мкг/мл). [28].

Як рамноліпіди, так і софороліпіди також виявили активність проти *P. aeruginosa* і *S. aureus*. Використовуючи комбінацію каприлової кислоти (0,01% об/об) і рамноліпідів (0,04% об/об) викликала руйнування одиничних і змішаних біоплівок для *P. aeruginosa* і *S. aureus* [49].

Крім того можливе використання сумішей софороліпідів, SLA, SL18 і SLV щодо утворення біоплівки *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *C. albicans* та попередньо сформованих біоплівок. Даний комплекс здатен пригнічувати утворення мікробних біоплівок до 90–95 % [50].

Попереднє покриття ПАР, синтезована *Bacillus subtilis* AC7, у комбінації з фарнезолом значно зменшила адгезію трьох штамів *C. albicans* в діапазоні від

72,1% до 75,9% і зростання біоплівки за 24 години в діапазоні від 83,8% до 92,9% [25].

За даними статті даптоміцин демонстрував антибіоплівкову активність проти зрілих біоплівок *Enterococcus faecalis* та бактерицидну дію на прилиплі клітини, тоді як даптоміцин у поєднанні з фосфоміцином демонстрував значно більшу антибіоплівкову активність, ніж даптоміцин чи фосфоміцин окремо, та ефективно вбивали адгезивні клітини в зрілих біоплівках [51].

Крім комбінації антибіотиків з поверхнево-активним речовинами, використовують також і інші біоцидні речовини.

Так наприклад, обробка ципрофлоксацином біоплівок, утворених *S. aureus* і *B. cereus*, спричинила зменшення їх біоплівок приблизно на 11% і 13% відповідно (порівняно з біоплівками без будь-яких обробок) у той час як комбінована обробка їх біоплівок 1 мкг ципрофлоксацину та 310 нМ цис-2-деценовою кислотою призвело до видалення їх біоплівок на 87% і 89% відповідно [14]. Також було досліджено вплив цис-2-деценової кислоти у комбінації з антибіотиками на руйнування комплексної біоплівки *E. coli* + *K. pneumoniae*, що призвело до 90 % зменшення біомаси біоплівки в одновидових біоплівках і на ~ 80 % видалення біоплівки у двовидових біоплівок [15].

За даними статті [52] пептид 1018 виявив синергічну взаємодію з усіма антибіотиками (цефтазидим, тобраміцин, ципрофлоксацин, імпіпенем), , проти біоплівок *P. aeruginosa* PA14, *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* O157, *Salmonella enterica* 14028S, *S. aureus* SAP0017, *Klebsiella pneumoniae* ATTC 13883, *Acinetobacter baumannii* SENTRY 8, *Burkholderia cenocepacia* 4813. Найкращий результат спостерігався у випадку використання суміші ципрофлоксацину (FIC = 0,14), у якому було показано 16-кратне зниження концентрації ципрофлоксацину, необхідної для інгібування росту біоплівки при застосуванні в комбінації з 1018. Пептид 1018 також був синергічним з аміноглікозидним антибіотиком тобраміцином (FIC = 0,38) у пригніченні утворення біоплівки *E. coli* O157.

В статті [53] описано можливість використання окситетрацикліну у комбінації з субтилізином А (протеолітичний фермент з класу серинових протеїназ, який продукується бактеріями, переважно роду *Bacillus*). Комбінація окситетрацикліну і субтилізину А мала адитивний ефект (середнє зниження - 2 \log_{10} КУО/мл) на бактеріях MSSA.

За даними статті [54] комбінація лише 0,125 мкг/мл пептиду DJK-6 і 0,0625 мкг/мл меропенему знищує вже утворенні біоплівки, таким чином зменшуючи щонайменше в 16 разів концентрацію меропенему, необхідну для руйнування біоплівок, утворених штамом *K. pneumoniae* 1825971.

Ще один приклад синергізму абіотичних сполук - 50,4 мг ефірної олії *Cinnamomum zeylanicum* необхідні для інгібування біоплівки *E. faecalis* ATCC 29212, коли ЕО поєднується з антибіотиком оксациліном, ця кількість різко зменшується з 50,4 мг/мл до 2,5 мг/мл. Якщо взяти до уваги цей штам, то асоціація ЕО-оксацилін викликає значне руйнування біоплівки, що дорівнює $56,6 \pm 1,00\%$ [55].

4.3 Вплив препаратів поверхнево-активних речовин, отриманих за наявності бактеріальних індукторів, у суміші з антибіотиками на ступінь руйнування біоплівки

4.3.1. *Pseudomonas* sp. MI-2

Дані таблиці 4.10 демонструють руйнування біоплівки *Pseudomonas aureginosa* MI-2 за дії поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за наявності клітин-індукторів, антибіотиків та їх суміші.

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що використання комплексу препаратів ПАР, синтезованих за наявності індуктора *B. subtilis* БТ-2, та офлоксацину у концентрації 15,6-31,3 мг/мл та ципрофлоксацину у концентрації 62,5-125 мкг/мл, продемонструвало підвищення ступеню руйнування біоплівки *P. aureginosa* MI-2 до 75-76 %, порівняно з використанням монопрепаратів. Так, у випадку використання

офлоксацину чи ципрофлоксацину за концентрації 125-250 мкг/мл, ступінь руйнування становив 41-49%, ПАР у концентрації 7,8-15,6 мкг/мл – 52-54%.

Аналогічні закономірності простежувались і у випадку використання ПАР, синтезованих за наявності як індуктора *E. coli* ІЕМ-1, та антибіотиків. Ступінь руйнування 98% спостерігався у випадку використання комплексу ПАР та офлоксацину за концентрації 62,5-125 мкг/мл, дещо нижчі результати 81-90% за концентрації 125-250 мкг/мл за використання ципрофлоксацину та ПАР. В свою чергу використання монопрепаратів у концентрації 125-250 мкг/мл, дозволило зруйнувати мікробну біоплівку лише на 51-53%, що майже у 2 рази нижче, ніж у разі використання комплексу препаратів.

Руйнування біоплівки *Pseudomonas aureginosa* МІ-2 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Індуктор	Концентрація препаратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлоксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлоксацину і ПАР
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	250	43	46	5	59	58
	125	41	49	7	81	76
	62.5	36	38	5	58	75
	31.3	32	36	39	76	59
	15.6	28	33	52	76	59
	7.8	25	27	54	32	49
	3.9	21	24	42	34	40
	2	14	18	5	40	44
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	250	43	46	53	85	90
	125	41	49	48	98	81
	62.5	36	38	45	98	56
	31.3	32	36	35	85	46
	15.6	28	33	2	58	58
	7.8	25	27	20	48	44
	3.9	21	24	19	40	40
	2	14	18	16	47	35

4.3.2 *Proteus vulgaris* БТ-1

Дані таблиці 4.11 демонструють руйнування біоплівки *Proteus vulgaris* БТ-1 за дії поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за наявності клітин-індукторів, антибіотиків та їх суміші.

Використання офлоксацину у концентрації 250 мкг/мл дозволило зруйнувати біоплівку на 41%, ципрофлоксацин у концентрації 31,3 мкг/мл, ПАР, отримані за наявності індуктора *B. subtilis* БТ-2, у концентрації 125 мкг/мл – 36%.

В свою чергу у разі використання суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності індуктора *B. subtilis* БТ-2, та офлоксацину за концентрації 15,6 та 31,3 мкг/мл ступінь руйнування біоплівки становив 65%, а ципрофлоксацину за концентрації 31,3 та 62,5 мкг/мл – 71-72%, що у 2 рази більше, порівнюючи з монопрепаратами.

Схожі результати і у разі використання як індуктора *E. coli* ІЕМ-1. Дія комплексу ПАР та офлоксацину у концентрації 125-250 мкг/мл, зруйнувала мікробну біоплівку на 71-76%, а ципрофлоксацину за концентрації 125 мкг/мл - 80%.

**Руйнування біоплівки *Proteus vulgaris* БТ-1 за дії ПАР *R. erythropolis*
ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші**

Індуктор, що був	Концен- трація препа- ратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлокса -цину	ципрофлок -сацину	ПАР	суміші офлокса- цину і ПАР	суміші ципро- флорсацину і ПАР
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	250	41	35	31	17	59
	125	33	32	36	41	67
	62.5	32	32	30	59	72
	31.3	35	36	30	65	71
	15.6	27	35	25	65	55
	7.8	29	22	9	49	51
	3.9	19	26	23	44	45
	2	17	13	15	41	48
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	250	41	35	1	71	10
	125	33	32	39	76	80
	62.5	32	32	1	2	59
	31.3	35	36	33	74	63
	15.6	27	35	25	8	44
	7.8	29	22	8	3	75
	3.9	19	26	2	7	3
	2	17	13	19	33	44

4.2.3. *Staphylococcus aureus* БМС-1

Дані таблиці 4.12 демонструють руйнування біоплівки *S. aureus* БМС-1 за дії поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за наявності клітин-індукторів, антибіотиків та їх суміші.

Використання суміші ПАР, отриманих за наявності *B. subtilis* БТ-2, разом з офлоксацином у концентрації 12,2 мкг/мл та 195 мкг/мл демонструвало 71-73% руйнування біоплівки штаму БМС-1. В свою чергу використання суміші з ципрофлоксацином за концентрації 97,5-195 мкг/мл демонструвало 71-88% руйнування.

За аналогічних концентрацій ступінь руйнування біоплівки монопрепаратами становив 36-38% для офлоксацину, 39-40% для ципрофлоксацину та 58-64 для препаратів ПАР.

Схожа ситуація і з ПАР, отриманими за наявності *E. coli* ІЕМ-1. Суміжне використання даного ПАР з офлоксацином дозволило зруйнувати біоплівку на 65-67% (концентрація 15,6-62,5 мкг/мл), а з ципрофлоксацином на 61-65% (концентрація 15,6-31,3 мкг/мл).

Нижчі результати спостерігались у разі використання тільки одного з препаратів. За концентрації 125-250 мкг/мл офлоксацин демонстрував 38-40% руйнування, ципрофлоксацин – 39-47%, а ПАР – 48-56%.

Руйнування біоплівки *Staphylococcus aureus* БМС-1 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Індуктор	Концентрація препаратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлораксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлораксацину і ПАР
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	195	38	40	64	73	88
	97,5	36	39	58	59	71
	48,88	30	41	45	63	61
	24,4	31	34	44	59	51
	12,2	23	30	32	71	59
	6,1	22	29	34	63	57
	3	19	25	29	51	43
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	250	40	47	56	63	50
	125	38	39	48	63	57
	62.5	36	33	47	65	59
	31.3	32	11	43	67	61
	15.6	29	29	57	65	65
	7.8	25	28	42	57	59
	3.9	23	21	23	47	43
	2	21	19	18	39	41

4.3.4. *Enterobacter cloacae* С-8

Дані таблиці 4.13 демонструють руйнування біоплівки *E. cloacae* С-8 за дії поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих за наявності клітин-індукторів, антибіотиків та їх суміші.

Не виключення підвищення ступеня руйнування біоплівки, у разі використання суміші препаратів ПАР, отриманих за наявності індуктора *B. subtilis* БТ-2 та антибіотиків, і для *E. cloacae* С-8. Так використання даного комплексу за концентрації 195 мкг/мл руйнувало мікробну біоплівку на 80-82%. В свою чергу за таких ж концентрацій антибіотики змогли зруйнувати лише на 24-35%, що у більше ніж у 2 рази менше.

Порівнюючи використання монопрепаратів та комплексу ПАР, отриманих за наявності *E. coli* ІЕМ-1, можна зробити висновок, що другий варіант ефективніше, оскільки 62,5-125 мкг/мл офлоксацину та ПАР руйнувало 54-56%, 7,8 мкг/мл – 61%. У випадку ципрофлоксацину дещо нижчі результати – 48% (концентрація 7,8 мкг/мл та 125 мкг/мл).

Руйнування біоплівки *Enterobacter cloacae* С-8 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Індуктор Субстрат - етанол	Концен- трація препа- ратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлокса -цину	ципрофлок -сацину	ПАР	суміші офлокса- цину і ПАР	суміші ципро- флорсацину і ПАР
<i>Bacillus subtilis</i> БТ- 2	195	24	35	62	82	80
	97,5	27	26	52	59	63
	48,88	19	30	44	57	60
	24,4	20	31	48	45	52
	12,2	16	20	36	38	44
	6,1	14	29	35	34	36
	3	18	18	24	30	33
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	250	42	39	28	44	28
	125	37	46	46	56	48
	62.5	44	50	33	54	43
	31.3	29	50	43	48	31
	15.6	27	36	46	50	35
	7.8	27	25	32	61	48
	3.9	28	17	28	48	31
	2	17	16	23	54	30

Отже, отримані результати засвідчують можливість підвищення ступеня деструкції бактеріальних біоплівок, у разі використання поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, отриманих за наявності у середовищі культивування продуцента біологічного індуктора *Bacillus subtilis*

BT-2 чи *Escherichia coli* IEM-1, у суміші з антибіотиками (офлоксацином та ципрофлоксацином).

В закордонній літературі досить небагато згадок про дію комплексів препаратів, що отриманих за наявності індукторів. досягнення в мікробній геноміці однозначно продемонстрували, що біосинтетичний потенціал мікробів для виробництва натуральних продуктів набагато вищий, ніж зараз оцінюється

До цих пір науковці, які займаються дослідженнями природних продуктів, біотехнологією та мікробіологією, працюють над відкриттям спільного культивування або експериментів зі змішаними культурами, щоб вивчити різницю у вторинних метаболітах, що утворюються під час цих випробувань, порівняно з «аксенічним ростом».

Дослідження взаємодії мікробних форм та їх використання у виробництві вторинних метаболітів є корисним у процесі відкриття природних продуктів для виробництва ліків [56].

Спільне культивування можна вважати експериментальною імітацією конкуренції в природних мікробних спільнотах у лабораторному масштабі, яка може сприяти виробленню вторинних метаболітів . Спільне культивування з невеликими кількостями патогенів може створювати стресори, які сприяють підвищенню біосинтезу активних антибактеріальних сполук [57].

Спільне культивування морських грибів *Aspergillus fumigatus* разом із двома ізолятами пустельних бактерій дало нові сполуки, а саме лютеорид D і псевдотин G [58].

У цьому дослідженні [59] гриб *A. sydowii* культивували спільно з бактерією *B. subtilis* і було виявлено 206 ознак сильного сигналу у відповідь, інтенсивність яких перевищувала 10% від найвищих піків інтенсивності.

Культивування *Streptomyces* sp. PTY087I2 за наявності індукторів *Bacillus subtilis*, метицилін-чутливим *Staphylococcus aureus* (MSSA), метицилін-резистентним *Staphylococcus aureus* (MRSA) і *Pseudomonas aeruginosa*, дало змогу оцінити рівень антимікробної речовини утвореної без та за участі індукторів. Результати показали, що використання як індукторів *B. subtilis* та

MRSA значно збільшило кількість гранатицину – антибіотику, продуцентом якого є *Streptomyces* sp. PTY087I2 [60].

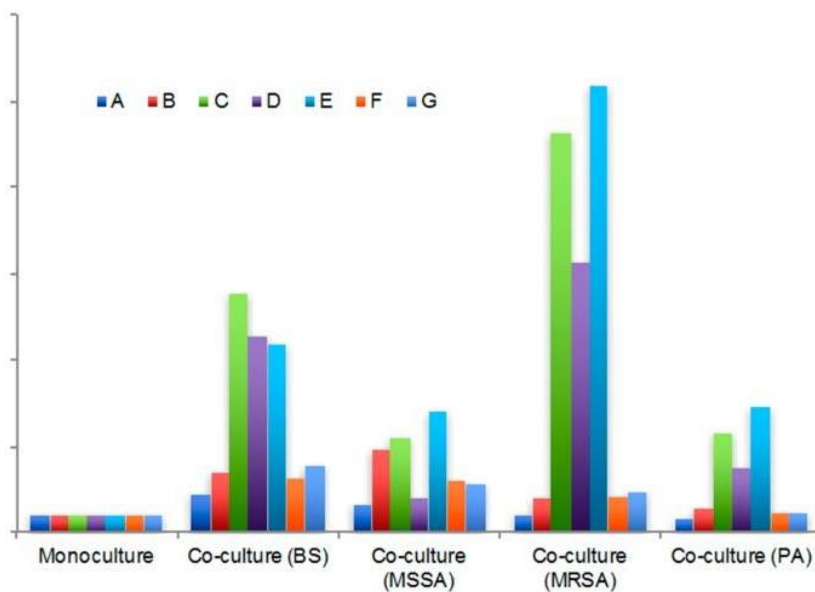


Рис. 4.1 Концентрація гранатицину при культивуванні *Streptomyces* sp. PTY087I2 [60]

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 ТА АНТИБІОТИКІВ НА СТУПІНЬ РУЙУВАННЯ ДВОВИДОВИХ БІОПЛІВОК

Мікробні біоплівки відповідальні за етіологію та патогенез багатьох гострих та хронічних бактеріальних хвороб, як приклад інфекції сечовивідної системи (пієлонефрит, цистит). Утворення біоплівок підвищує виживання бактерій у навколишньому середовищі. Як зазначено вище відмінними особливостями біоплівки, в порівнянні з колоніями мікроорганізмів, є наявність позаклітинного матриксу, наявність у бактерій генів, що контролюють біоплівкоутворення, складна архітектурна структура .

5.1 Руйнування бактеріальних біоплівок тест-культур за дії комплексу поверхнево-активних речовин з антибіотиками

5.1.1 *Pseudomonas aureginosa* МІ-2 та *Staphylococcus aureus* БМС-1

Дані *таблиці 5.1* демонструють ступінь руйнування біоплівок, утворених бактеріями *P. aureginosa* МІ-2 та *S. aureus* БМС-1. Як видно використання антибіотику офлоксацину вдалося зруйнувати комплексну біоплівку на 58-63% за концентрації 62,5-125 мкг/мл та на 57% за концентрації 7,8-15,6 мкг/мл; ципрофлоксацин 58-66 % за концентрації 125-250 мкг/мл. В свою чергу використання поверхнево-активних речовин, отриманих на очищеному гліцерині, демонструвало 52-54% за аналогічних концентрацій, а ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизелю, 48-55%.

Використання суміші ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, з антибіотиком ципрофлоксацином дозволило зруйнувати двовидову бактеріальну біоплівку на 43-45% за концентрацій 15,6-31,3 мкг/мл, а офлоксацином за концентрації 250 мкг/мл - 49%, за 62,5 мкг/мл - 51%.

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ				
		<i>№</i>	<i>П</i>						
Розроб.	Жалюк Д.В.			РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCUS ERYTHROPOLIS</i> ІМВ АС-5017 ТА АНТИБІОТИКІВ НА СТУПІНЬ РУЙНУВАННЯ ДВОВИДОВИХ БІОПЛІВОК	<i>Л</i>	<i>А</i>	<i>Акруші</i>		
Перевірив	Пирог Т.П.				79	61			
<i>Конс</i>					Кафедра БТМ				
Затверд.	Стабніков В.П.								

Використання ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизелю, у комплексі з антибіотиками демонструвало схожі результати. Так, ступінь руйнування біоплівки, у разі використання офлоксацину у концентрації 125-500 мкг/мл становив 46-55%, а ципрофлоксацину за концентрації 7,5-62,5 мкг/мл - 45-47%.

Таблиця 5.1

Руйнування комбінованої біоплівки *Pseudomonas aureginosa* МІ-2 та *Staphylococcus aureus* БМС-1 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація препаратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлор-сацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлорсацину і ПАР
Очищений гліцерин	500	52	44	48	35	22
	250	58	58	52	49	30
	125	63	66	54	40	39
	62.5	53	46	40	51	41
	31.3	42	45	40	36	45
	15.6	57	48	49	27	43
	7.8	57	54	35	25	37
	3.9	48	49	35	20	23
Відходи виробництва біодизелю	500	52	44	35	46	26
	250	58	58	44	48	35
	125	63	66	52	55	35
	62.5	53	46	47	32	46
	31.3	42	45	37	28	47
	15.6	57	48	34	40	46
	7.8	57	54	25	43	45
	3.9	48	49	18	48	37

5.1.2 *Escherichia coli* IEM-1 та *Staphylococcus aureus* БМС-1

Дані *таблиці 5.2* демонструють ступінь руйнування двовидової біоплівки *E. coli* IEM-1 та *S. aureus* БМС-1 за дії ПАР та антибіотиків окремо та у суміші.

Так, використання ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, за концентрації 62,5-250 мкг/мл дозволило зруйнувати утворену біоплівку на 50-57%. В свою сергу, ПАР, отримані на відходах від виробництва біодизелю, за концентрації 250 мкг/мл – 50%. Дія антибіотиків у концентрації 62,5-125 мкг/мл для офлоксацину, 125-500 мкг/мл для ципрофлоксацину, зруйнувало біоплівку бактерій на 40-52% та 57-60% відповідно.

Для порівняння використання ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, з офлоксацином у за аналогічних концентрацій, що і антибіотики використовувались окремо – 62,5-500 мкг/мл, демонструвало 53-55% руйнування. Схожа ситуація у разі використання поверхнево-активних речовин, отриманих на субстраті – відходи від виробництва біодизелю. А саме ступінь руйнування був на рівні 47-49 % за концентрації препаратів ПАР та офлоксацину 62,5-250 мкг/мл та 43-45 % у разі використання у комплексі з ципрофлоксацином у концентрації 15,6-125 мкг/мл.

Руйнування комбінованої біоплівки *Escherichia coli* ІЕМ-1 та *Staphylococcus aureus* БМС-1 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат для біосинтезу	Концентрація препаратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлоксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлоксацину і ПАР
Очищений гліцерин	500	27	57	31	53	19
	250	29	60	57	54	29
	125	52	57	57	55	54
	62.5	40	40	50	55	42
	31.3	38	43	41	48	37
	15.6	37	45	36	60	29
	7.8	34	45	34	43	24
	3.9	27	43	29	30	20
Відходи виробництва біодизелю	500	27	57	39	34	32
	250	29	60	50	47	36
	125	52	57	38	49	43
	62.5	40	40	34	49	45
	31.3	38	43	31	36	45
	15.6	37	45	29	32	43
	7.8	34	45	27	27	33
	3.9	27	43	25	19	33

5.2 Руйнування бактеріально-дріжджових біоплівки тест-культур за дії комплексу поверхнево-активних речовин з антибіотиками

5.2.1 *Escherichia coli* IEM-1 та *Candida albicans* D-6

Дані *таблиці 5.3* демонструють ступінь руйнування змішаної біоплівки бактерії *E. coli* IEM-1 та дріжджів *C. albicans* D-6 у разі дії поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 окремо та у комплексі з антибіотиками.

Як видно використання монопрепаратів антибіотиків найкращі результати демонструвало на рівні 52-55 % у разі використання офлоксацину та 54-59% - ципрофлоксацину за концентрації 31,3-62,5 мкг/мл. Дещо нижчі результати у випадку використання поверхнево-активних речовин, отриманих на очищеному гліцерині, 41-45% за концентрації 125-250 мкг/мл та ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизелю, 44-49 % у концентрації 31,3-125 мкг/мл.

В свою чергу використання комплексу антибіотиків та ПАР демонструвало аналогічні результати. Так, наприклад, суміш офлоксацину та ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, у концентрації 31,3-125 мкг/мл ступінь руйнування становив 40-45 %, а з ципрофлоксацином дещо вищих концентраціях 250-500 мкг/мл – 54-56%.

Аналогічні дані і у випадку використання суміші антибіотиків з ПАР, отриманих на субстраті відхід від виробництва біодизелю. У разі використання офлоксацину у концентрації 31,3-125 мкг/мл ступінь руйнування становив 43-47 %. А у разі використання як антибіотику ципрофлоксацину у концентраціях 125-500 мкг/мл ступінь руйнування був на рівні 49-51 %.

Руйнування комбінованої біоплівки *Escherichia coli* IEM-1 та *Candida albicans* D-6 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат	Концентрація препаратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлораксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлораксацину і ПАР
Очищений гліцерин	500	51	40	37	27	56
	250	61	44	41	37	54
	125	49	48	45	43	48
	62.5	52	59	36	45	47
	31.3	55	54	31	40	40
	15.6	43	47	32	39	43
	7.8	37	34	24	34	31
	3.9	31	33	27	33	23
Відходи виробництва біодизелю	500	51	40	24	32	49
	250	61	44	33	34	51
	125	49	48	49	43	49
	62.5	52	59	45	45	37
	31.3	55	54	44	47	33
	15.6	43	47	35	39	31
	7.8	37	34	32	34	27
	3.9	31	33	22	32	23

5.2.2 *Staphylococcus aureus* БМС-1 та *Candida albicans* D-6

Результати руйнування комплексної біоплівки *S. aureus* БМС-1 та *C. albicans* D-6 препаратами ПАР та антибіотиків продемонстровано у таблиці 5.4.

Використання офлоксацину дозволило зруйнувати біоплівку досліджуваного комплексу бактерія-дріжджі на 52-58 % за концентрації 15,6-62,5 мкг/мл, ципрофлоксацину – 60-67 %, ПАР, отриманих на очищеному гліцерині, - 57-61 %, а ПАР отриманих на відходах від виробництва біодизелю, - 46-65 %.

Використання комплексу антибіотиків з ПАР, демонструвало кращі результати. Так, ПАР, отримані на очищеному гліцерині, та офлоксацин за концентрації 31,3-62,5 мкг/мл зруйнував біоплівку на 70-84 %, а ципрофлоксацин за діапазону концентрацій 15,6-500 мкг/мл на 70-80%, що більше ніж у 1,5 рази більше, ніж у разі використання монопрепаратів.

Дещо нижчі результати, у разі використанні ПАР, отриманих на відходах від виробництва біодизелю. А саме 65-69% у разі використання офлоксацину у концентрації 125-250 мкг/мл та ципрофлоксацину у 125-500 мкг/мл – 67-68 %.

Руйнування комбінованої біоплівки *Staphylococcus aureus* БМС-1 та *Candida albicans* D-6 за дії ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, антибіотиків та їх суміші

Субстрат	Концентрація препаратів, мкг/мл	Ступінь руйнування біоплівки (%) за дії				
		офлоксацину	ципрофлораксацину	ПАР	суміші офлоксацину і ПАР	суміші ципрофлораксацину і ПАР
Очищений гліцерин	500	42	45	34	41	73
	250	43	57	42	50	75
	125	45	59	52	55	80
	62.5	52	60	57	84	74
	31.3	53	67	61	70	71
	15.6	58	67	60	47	70
	7.8	45	51	57	42	62
	3.9	38	44	52	38	51
Відходи виробництва біодизелю	500	42	45	37	59	68
	250	43	57	38	65	66
	125	45	59	53	69	67
	62.5	52	60	65	72	56
	31.3	53	67	55	81	46
	15.6	58	67	46	74	42
	7.8	45	51	40	69	32
	3.9	38	44	36	58	27

Враховуючи вищенаведені результати, можемо зробити висновок, що було неправильно підібрано антимікробні речовини синергетики.

Поверхнево-активні речовини, синтезовані *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, та вибрані антибіотики (офлоксацин та ципрофлораксацин) мають вплив

на прокаріотичні мікроорганізми (бактерії). Вплив даних препаратів на еукаріотичні мікроорганізми (дріжджі) не досліджувався.

Відповідно до отриманих результатів синергізму дії (ПАР та антибіотиків) на комплекси, що включають бактерії та дріжджі немає. Можемо зробити припущення, що в свою чергу препарати (антибіотики і ПАР) у даному випадку інгібують ріст бактерій, відповідно ріст еукаріотів інтенсивніший, що в свою чергу призводить до низького рівня деструкції комплексної біоплівки.

ВИСНОВОК

1. В літературному огляді було підсумовано та узагальнено дані щодо синергічної антиадгезивної дії суміші антибіотиків, первинних та вторинних мікробних біоцидів (поверхнево-активні речовини, ферменти, кислоти) та моно та багатовидові біоплівки.

2. Встановлено, що поверхнево-активні речовини *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, отримані на промислових відходах (відходи від виробництва біодизелю та очищений гліцерин), здатні проявляти синергічну антиадгезивну активність та здатність до руйнування біоплівки у суміші з антибіотиками ципрофлоксацином та офлоксацином, щодо бактеріальних тест-культур.

3. Встановлено, що поверхнево-активні речовини *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, отримані за наявності бактеріальних індукторів, є можливим способом підвищення ступеня деструкції бактеріальних біоплівок у суміші з антибіотиками ципрофлоксацином та офлоксацином.

4. Встановлено, що поверхнево-активні речовини *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, отримані на промислових відходах (відходи від виробництва біодизелю та очищений гліцерин), у комплексі з антибіотиками (ципрофлоксацином та офлоксацином) тільки частково здатні впливати на двовидову (бактеріальну та бактеріально-дріжджеву) біоплівку.

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ			
		№	П			Л	А	Акруші
Розроб.	Жалюк Д.В.							
Перевірив	Пирог Т.П.						79	70
Конс					ВИСНОВОК	Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гуменюк М.І., Денисов О.С., Фещенко Ю.І. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів. стан проблеми та шляхи вирішення *Український хімотерапевтичний журнал* — №1-2 (23) — 2010 <https://www.uf.ua/ua/terapevt/antybiotykorezystentnist-mikroorganizmiv-stan-problemy-ta-shlyahy-vyrishennya/>
2. Романюк Л.Б., Кравець Н.Я., Климнюк С.І., Копча В.С., Дронова О.Й. Антибіотикорезистентність умовно-патогенних мікроорганізмів: актуальність, умови виникнення, шляхи подолання *Інфекційні хвороби*, (4), 63–71. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2019.4.10965>
3. Яворська, Л. В. Антибіотикорезистентність: механізми розвитку та шляхи вирішення проблеми *Youth Pharmacy Science* : матеріали І Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 27-29 квіт. 2021 р. – Харків : НФаУ, 2021. – С. 230-233.
4. World Health Organization. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. *World Health Organization*, 2001. No. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.
5. EARSS Annual Report 2008. On-going surveillance of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Period of data collection: January 1999 – December 2008 This document was prepared by the EARSS Management Team, members of the Advisory Board, and national representatives of EARSS, Bilthoven, The Netherlands, October 2009.
6. Фогел І. І., Кривцова М. В., Бугір Й. Й. Антибіотикорезистентність. масштаби та актуальність досліджень циркуляції антибіотикорезистентних ізолятів серед дітей *Український журнал медицини, біології та спорту* – 2021 – Том 6, № 4 (32)
7. Тіщенко І.Ю., Місюрьова С.В., Дубініна Н.В., Дубініна Ю.В., Нардід Х.В. Антибіотикорезистентність і біоплівки мікроорганізмів «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи»: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар.

участю, присвяч. 100-річчю Національного фармацевтичного університету, м. Харків, 10 верес. 2021 р. - Харків : НФаУ, 2021. - С. 524-526.

8. Mishra R, Panda AK, De Mandal S, Shakeel M, Bisht SS, Khan J. Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:566325. doi:10.3389/fmicb.2020.566325

9. Hu WS, Min Nam D, Kim JS, Koo OK. Synergistic anti-biofilm effects of Brassicaceae plant extracts in combination with proteinase K against *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep*. 2020;10(1):21090. doi:10.1038/s41598-020-77868-4

10. Araújo PA, Machado I, Meireles A, et al. Combination of selected enzymes with cetyltrimethylammonium bromide in biofilm inactivation, removal and regrowth. *Food Res Int*. 2017;95:101-107. doi:10.1016/j.foodres.2017.02.016

11. Jee SC, Kim M, Sung JS, Kadam AA. Efficient Biofilms Eradication by Enzymatic-Cocktail of Pancreatic Protease Type-I and Bacterial α -Amylase. *Polymers (Basel)*. 2020;12(12):3032. doi:10.3390/polym12123032

12. Rodríguez-López P, Carballo-Justo A, Draper LA, Cabo ML. Removal of *Listeria monocytogenes* dual-species biofilms using combined enzyme-benzalkonium chloride treatments. *Biofouling*. 2017;33(1):45-58. doi:10.1080/08927014.2016.1261847

13. Fanaei Pirlar R, Emaneini M, Beigverdi R, Banar M, B van Leeuwen W, Jabalameli F. Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium. *PLoS One*. 2020;15(6):e0235093. doi:10.1371/journal.pone.0235093

14. Sepehr S, Rahmani-Badi A, Babaie-Naiej H, Soudi MR. Unsaturated fatty acid, cis-2-decenoic acid, in combination with disinfectants or antibiotics removes pre-established biofilms formed by food-related bacteria. *PLoS One*. 2014;9(7):e101677. doi:10.1371/journal.pone.0101677

15. Rahmani-Badi A, Sepehr S, Mohammadi P, Soudi MR, Babaie-Naiej H, Fallahi H. A combination of cis-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 11):1509-1516. doi:10.1099/jmm.0.075374-0

16. Warraich AA, Mohammed AR, Perrie Y, Hussain M, Gibson H, Rahman A. Evaluation of anti-biofilm activity of acidic amino acids and synergy with ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Sci Rep.* 2020;10(1):9021. doi:10.1038/s41598-020-66082-x
17. Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo JM, Beloin C. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or l-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1704-1712. doi:10.1093/jac/dkv044
18. Zhao L, Jiang J, Zhu Z, et al. Lysine enhances the effect of amphotericin B against *Candida albicans* in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2016;48(2):182-193. doi:10.1093/abbs/gmv125
19. Pese S, Angkananuwat C, Tancharoensukjit S, et al. In vitro activity of Caspofungin combined with Fluconazole on mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilm. *Med Mycol.* 2016;54(4):384-393. doi:10.1093/mmy/myv108
20. Díaz C, Miñán A, Schilardi PL, Fernández Lorenzo de Mele M. Synergistic antimicrobial effect against early biofilm formation: micropatterned surface plus antibiotic treatment. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40(3):221-226. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.05.012
21. Hasan S, Albayaty YNS, Thierry B, Prestidge CA, Thomas N. Mechanistic studies of the antibiofilm activity and synergy with antibiotics of isosorbide mononitrate. *Eur J Pharm Sci.* 2018;115:50-56. doi:10.1016/j.ejps.2018.01.003
22. Paris JB, Seyer D, Jouenne T, Thébault P. Elaboration of antibacterial plastic surfaces by a combination of antiadhesive and biocidal coatings of natural products. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;156:186-193. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.025
23. Sharma G, Dang S, K A, Kalia M, Gabrani R. Synergistic antibacterial and anti-biofilm activity of nisin like bacteriocin with curcumin and cinnamaldehyde

against ESBL and MBL producing clinical strains. *Biofouling*. 2020;36(6):710-724. doi:10.1080/08927014.2020.1804553

24. Ceresa C, Fracchia L, Fedeli E, Porta C, Banat IM. Recent Advances in Biomedical, Therapeutic and Pharmaceutical Applications of Microbial Surfactants. *Pharmaceutics*. 2021;13(4):466. doi:10.3390/pharmaceutics13040466

25. Chiara Ceresa, Francesco Tessarolo, Devid Maniglio, Iole Caola, Giandomenico Nollo, Maurizio Rinaldi, Letizia Fracchia. Inhibition of *Candida albicans* biofilm by lipopeptide AC7 coated medical-grade silicone in combination with farnesol[J]. *AIMS Bioengineering*, 2018, 5(3): 192-208. doi: 10.3934/bioeng.2018.3.192

26. Diaz De Rienzo MA, Stevenson PS, Marchant R, Banat IM. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(13):5773-5779. doi:10.1007/s00253-016-7310-5

27. Juma A, Lemoine P, Simpson ABJ, et al. Microscopic Investigation of the Combined Use of Antibiotics and Biosurfactants on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2020;11:1477. doi:10.3389/fmicb.2020.01477

28. Chen X, Li P, Shen Y, Zou Y, Yuan G, Hu H. Rhamnolipid-involved antibiotics combinations improve the eradication of *Helicobacter pylori* biofilm in vitro: A comparison with conventional triple therapy. *Microb Pathog*. 2019;131:112-119. doi:10.1016/j.micpath.2019.04.001

29. Rivardo F, Martinotti MG, Turner RJ, Ceri H. Synergistic effect of lipopeptide biosurfactant with antibiotics against *Escherichia coli* CFT073 biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(4):324-331. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.12.011

30. Haque F, Sajid M, Cameotra SS, Battacharyya MS. Anti-biofilm activity of a sophorolipid-amphotericin B niosomal formulation against *Candida albicans*. *Biofouling*. 2017;33(9):768-779. doi:10.1080/08927014.2017.1363191

31. Haque F, Alfatah M, Ganesan K, Bhattacharyya MS. Inhibitory Effect of Sophorolipid on *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Growth. *Sci Rep*. 2016;6:23575. doi:10.1038/srep23575
32. Khalid HF, Tehseen B, Sarwar Y, et al. Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. *J Hazard Mater*. 2019;364:441-448. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.10.049
33. Pohl CH. Recent Advances and Opportunities in the Study of *Candida albicans* Polymicrobial Biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:836379. doi:10.3389/fcimb.2022.836379
34. Rodrigues ME, Lopes SP, Pereira CR, et al. Polymicrobial Ventilator-Associated Pneumonia: Fighting In Vitro *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* Biofilms with Antifungal-Antibacterial Combination Therapy. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170433. doi:10.1371/journal.pone.0170433
35. Townsend EM, Sherry L, Kean R, et al. Implications of Antimicrobial Combinations in Complex Wound Biofilms Containing Fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(9):e00672-17. Published 2017 Aug 24. doi:10.1128/AAC.00672-17
36. Rogiers O, Holtappels M, Siala W, et al. Anidulafungin increases the antibacterial activity of tigecycline in polymicrobial *Candida albicans*/*Staphylococcus aureus* biofilms on intraperitoneally implanted foreign bodies. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(10):2806-2814. doi:10.1093/jac/dky246
37. Tan Y, Leonhard M, Moser D, Ma S, Schneider-Stickler B. 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*. 2019;174:28-34. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.10.079
38. Fernandes L, Fortes BN, Lincopan N, Ishida K. Caspofungin and Polymyxin B Reduce the Cell Viability and Total Biomass of Mixed Biofilms of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. *Front Microbiol*. 2020;11:573263. doi:10.3389/fmicb.2020.573263

39. Lobo CIV, Lopes ACUA, Klein MI. Compounds with Distinct Targets Present Diverse Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, and Combinations of Compounds Potentiate Their Effect. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(5):340. doi:10.3390/jof7050340
40. Кухтин М.Д., Перкій Ю.Б, Крушельницька Н.В Формування змішаних біоплівків мікроорганізмами, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого *Ветеринарна медицина* 2013,97:442-443.
41. Шинкарук О. Ю., Кухтин М. Д., Вічко О. І., Швед О. В., Марінцова Н. Є. Характеристика мийного засобу “Ензимий” за здатністю руйнування мікробних біоплівків *Вісник Національного університету Львівська політехніка* 2018:158-164
42. Ceresa C, Rinaldi M, Tessarolo F, et al. Inhibitory Effects of Lipopeptides and Glycolipids on *C. albicans-Staphylococcus* spp. Dual-Species Biofilms. *Front Microbiol*. 2021;11:545654.
43. E.Galdiero, A.Ricciardelli, C.D'Angelo, E.de Alteriis Pentadecanoic acid against *Candida albicans-Klebsiella pneumoniae* biofilm: towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections *Research in Microbiology* 2021, 172(7-8)
44. Рідкі біопалива: біоетанол та біодизель [Електронний ресурс] – режим доступу : <https://uabio.org/liquid-biofuels/>
45. Chatzifragkou A, Papanikolaou S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;95(1):13-27. doi:10.1007/s00253-012-4111-3
46. Giri S.S., Ryu E.C., Sukumaran V., Park S.C. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus strains*. *Microbial Pathogenesis*. 2019;132:66–72. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.035.
47. Elshikh M., Funston S., Chebbi A., Ahmed S., Marchant R., Banat I.M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral

hygiene related pathogens. *New Biotechnology* . 2017;36:26–36. doi: 10.1016/j.nbt.2016.12.009.

48. Elshikh M., Moya-Ramírez I., Moens H., Roelants S., Soetaert W., Marchant R., Banat I.M. Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: Natural antimicrobial surfactants for oral hygiene. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;123:1111–1123. doi: 10.1111/jam.13550.

49. Diaz De Rienzo M. A., Stevenson P. S., Marchant R., Banat I. M. (2016). Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 5773–5779. 10.1007/s00253-016-7310-5

50. Ceresa C., Fracchia L., Williams M., Banat I.M., Díaz De Rienzo M.A. The effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. *Journal of Biotechnology* . 2020;309:34–43. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.12.019.

51. Zheng JX, Sun X, Lin ZW, et al. In vitro activities of daptomycin combined with fosfomycin or rifampin on planktonic and adherent linezolid-resistant isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Medical Microbiology*. 2019;68(3):493-502. doi:10.1099/jmm.0.000945

52. Reffuveille F, de la Fuente-Núñez C, Mansour S, Hancock RE. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(9):5363-5371. doi:10.1128/AAC.03163-14

53. Liu, J., Madec, JY., Bousquet-Mélou, A. *et al.* Destruction of *Staphylococcus aureus* biofilms by combining an antibiotic with subtilisin A or calcium gluconate. *Scientific Reports* **11**, 6225 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85722-4>

54. Ribeiro SM, de la Fuente-Núñez C, Baquir B, Faria-Junior C, Franco OL, Hancock RE. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to β -lactam antibiotics.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 59(7):3906-12 (2015). doi: 10.1128/AAC.00092-15.

55. Rosato A, Sblano S, Salvagno L, Carocci A, Clodoveo ML, Corbo F, Fracchiolla G. Anti-Biofilm Inhibitory Synergistic Effects of Combinations of Essential Oils and Antibiotics. *Antibiotics*. 2020; 9(10):637. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100637>

56. Alhadrami HA, Thissera B, Hassan MHA, et al. Bio-Guided Isolation of Antimalarial Metabolites from the Coculture of Two Red Sea Sponge-Derived *Actinokineospora* and *Rhodococcus* spp. *Mar Drugs*. 2021;19(2):109.

57. Arora D, Gupta P, Jaglan S, Roullier C, Grovel O, Bertrand S. Expanding the chemical diversity through microorganisms co-culture: Current status and outlook. *Biotechnol Adv*. 2020;40:107521. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107521

58. Wakefield J., Hassan H.M., Jaspars M., Ebel R., Rateb M.E. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. *Front. Microbiol*. 2017;8:1284. doi: 10.3389/fmicb.2017.01284.

59. Sun Y, Liu WC, Shi X, et al. Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*. 2021;20(1):42. doi:10.1186/s12934-021-01527-0

60. Sung AA, Gromek SM, Balunas MJ. Upregulation and Identification of Antibiotic Activity of a Marine-Derived *Streptomyces* sp. via Co-Cultures with Human Pathogens. *Mar Drugs*. 2017;15(8):250. doi:10.3390/md15080250

ДОДАТКИ

Апробація результатів науково-дослідної роботи

1. Жалюк Д., Пирог Т. Синергічна дія на біоплівки суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 з антибіотиками. Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", Квітень – Травень 2022 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1. с. 309

Нагороди

1. Переможниця I туру Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт за спеціальністю «Біотехнології та біоінженерія» по секції «Фармацевтична та молекулярна біотехнологія». I місце – з роботою «Синергізм антимікробної дії суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 з іншими біоцидними сполуками» (керівниця – д.б.н., професорка Тетяна Пирог).