

DESTRUCTION OF BIOFILMS UNDER ACTION OF SURFACTANTS SYNTHESIZED BY *NOCARDIA VACCINI* IMV B-7405 ON WASTE OF BIODIESEL PRODUCTION

T. Pirog, L. Nikitiuk, K. Kondrashevskya, I. Kluchka

National University of Food Technologies

Key words:

Nocardia vaccinii IMV B-7405
Industrial waste
Surfactants
Biofilm disruption

Article history:

Received 09.11.2018
Received in revised form 23.11.2018
Accepted 18.12.2018

Corresponding author:

T. Pirog
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

Nowadays, the research of safe and effective compounds that would prevent the adhesion of microorganisms to surfaces, or destroy biofilm on various surfaces remains relevant. About 65—80% of all infectious diseases are caused by bacteria that form biofilms on the surface of medical implanted equipment (lenses, catheters, prostheses, artificial heart valves) or in food industry. Modern technologies of destruction of microbial biofilms involve the use of mechanical, physical, chemical and biological methods. In recent years, biological methods have been favored due to their high efficiency, prolonged action and safety for humans and the environment.

In the article the effect on disruption of bacterial and yeast biofilms of surfactants synthesized by *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on purified glycerol and waste biodiesel production was compared. The dependence of biofilms destruction under action of *N. vaccinii* IMV B-7405 surfactants on degree of glycerol purification, duration of producer cultivation, surfactant concentration and type of test culture was established. Increasing duration of IMV B-7405 cultivation from 5 to 7 days on purified glycerol was accompanied by synthesis of surfactants, in the presence of which destruction of biofilms of *Bacillus subtilis* BT-2, *Pseudomonas* sp. M-2 and *Candida albicans* D-6 declined. At the same time, disruption of biofilms under action of surfactants (140—280 µg/ml), synthesized during 7 days on waste biodiesel production, was 11—15% higher than in presence of preparations obtaining on this substrate during 5 days.

Replacing purified glycerol with waste of biodiesel production for *N. vaccinii* IMV B-7405 cultivation allows to dispose toxic waste, reduce cost of surfactants and obtain the final product with high anti-adhesive activity.

РУЙНУВАННЯ БІОПЛІВОК ЗА ДІЇ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ *NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405 НА ВІДХОДАХ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ

Т.П. Пирог, Л.В. Никитюк, К.Р. Кондрашевська, І.В. Ключка
Національний університет харчових технологій

Нині актуальним залишається пошук безпечних та ефективних сполук, які б перешкождали адгезії мікроорганізмів до поверхонь або ж руйнували вже існуючої біоплівки на різноманітних поверхнях. Серед усіх інфекційних захворювань близько 65—80% спричиняються бактеріями, які формують біоплівки на поверхні медичного імплантованого обладнання (лінзи, катетери, протези, штучні серцеві клапани) або харчової промисловості. Сучасні технології руйнування мікробних біоплівок передбачають використання механічних, фізичних, хімічних і біологічних методів. В останні роки перевага надається біологічним методам завдяки їх високій ефективності, пролонгованій дії, безпечності для людини і навколишнього середовища.

У статті порівняно вплив на руйнування бактеріальних і дріжджових біоплівок поверхнево-активних (ПАР), синтезованих *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю. Встановлено залежність ступеня руйнування біоплівок під впливом ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 від ступеня очищення гліцерину, тривалості культивування продуцента, концентрації ПАР у препаратах та типу тест-культури. Збільшення тривалості культивування штаму ІМВ В-7405 з 5 до 7 діб на очищеному гліцерині супроводжувалося синтезом поверхнево-активних речовин, за наявності яких ступінь руйнування біоплівок *Vacillus subtilis* БТ-2, *Pseudomonas* sp. М-2 і *Candida albicans* Д-6 знижувався. У той же час деструкція біоплівок за дії ПАР (140—280 мкг/мл), синтезованих упродовж 7 діб на відходах виробництва біодизелю, була на 11—15% вищою, ніж за наявності поверхнево-активних речовин, утворених на цьому субстраті упродовж 5 діб.

Заміна очищеного гліцерину на відходи виробництва біодизелю у середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 дає змогу утилізувати токсичні відходи, знизити собівартість ПАР і отримати цільовий продукт з високою антиадгезивною активністю.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, промислові відходи, поверхнево-активні речовини, деструкція біоплівки.

Постановка проблеми. Бактерії здатні адгезуватися на поверхні різних матеріалів і формувати біоплівку, небезпека утворення якої полягає в тому, що прикріплені мікробні клітини набувають резистентності до антимікробних препаратів [1—3]. Пошук безпечних та ефективних засобів, які б перешкождали адгезії мікроорганізмів до різноманітних поверхонь або ж руйнували архітектуру вже існуючої біоплівки, є актуальним, оскільки колонізація

бактеріями імплантатів, катетерів та інших медичних поверхонь призводить до інфікування пацієнтів з летальними випадками. Біоплівкоутворення на робочих поверхнях обладнання у харчовій промисловості спричиняє псування готової продукції.

Нині відомо багато способів руйнування мікробних біоплівок, зокрема застосування неорганічних сполук, хімічних препаратів, антибіотиків та бактеріофагової терапії [3]. Проте виникнення у мікроорганізмів резистентності до антибіотиків та інших біоцидів, дорожняча багатьох методів запобігання утворенню та руйнуванню біоплівок стимулювала пошук нових речовин з відповідними властивостями.

Мікробні ПАР розглядаються як альтернативна заміна хімічно-синтезованих речовин, тому що їм притаманні ряд переваг (біодеградабельність, нетоксичність, стабільні фізико-хімічні властивості, низький ризик появи резистентних мікроорганізмів) [4].

Проте практичне використання мікробних ПАР обмежується їх високою собівартістю. Здешевлення технології виробництва цільового продукту можна досягти культивуванням штаму-продуцента на промислових відходах, зокрема відходах виробництва біодизелю, зберігання яких є потенційною екологічною проблемою через підвищену лужність, вміст залишків токсичного метанолу, високої концентрацій солей і вільних жирних кислот [5].

Раніше [6] нами було показано, що поверхнево-активні речовини, синтезовані за умов росту *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на очищеному гліцерині, характеризувалися високою здатністю до руйнування біоплівки *Escherichia coli* ІЕМ-1 на полістиролі (ступінь руйнування близько 80%).

У [7] ми встановили можливість інтенсифікації синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відходах виробництва біодизелю, одержаних безпосередньо від заводу-виробника. Разом з тим наші попередні дані [8] засвідчують, що не завжди підвищення синтезу ПАР супроводжується утворенням цільового продукту з необхідними біологічними властивостями, що потребує проведення досліджень залежності властивостей поверхнево-активних речовин від умов культивування продуцента.

Мета статті: порівняння впливу на руйнування бактеріальних і дріжджових біоплівок поверхнево-активних (ПАР), синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження — ізольований нами із забрудненого нафтою ґрунту штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 та зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7405.

Як тест-культури для утворення біоплівки використовували бактерії *Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Pseudomonas* sp. М-2 і дріжджі *Candida albicans* Д-6 з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

N. vaccinii ІМВ В-7405 вирощували в колбах на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 5–7 діб в рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO₃ — 0,5; MgSO₄×7H₂O — 0,1; CaCl₂ — 0,1; КН₂Р₀₄ — 0,1;

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001, дріжджовий автолізат — 0,5% (об'ємна частка). Як джерело вуглецю використовували очищений гліцерин у концентрації 2% (об'ємна частка), а також відходи виробництва біодизелю (Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.) (2 %, об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5% відповідного субстрату. Інокулят, в якому чисельність бактерій становила 10^4 — 10^5 кл/мл, вносили у кількості 10% від об'єму середовища.

Кількість синтезованих позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом після екстракції з супернатанту культуральної рідини, модифікованою сумішшю Фолча. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g протягом 20 хв. Виділення позаклітинних ПАР здійснювали, як описано нижче.

У циліндричну ділильну лійку об'ємом 500 мл поміщали 100 мл супернатанту, додавали 20 мл 1 М розчину HCl, воронку закривали шліфованою пробкою і струшували 3 хв, потім додавали ще 15 мл 1 М розчину HCl і 65 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і струшували (екстрагування ліпідів) протягом 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали в ділильній воронці для поділу фаз, після чого нижню фракцію зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази додавали 35 мл 1 М розчину HCl і 65 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) й екстрагували ліпіди протягом 5 хв. Після поділу фаз зливали нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 100 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1—3 об'єднували й упарювали на роторному випарнику IP-1M2 (Росія) при 50°C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси. Всі препарати стерилізували при 112 °C протягом 30 хв.

У дослідженнях використовували препарати ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 різного ступеня очищення:

препарат 1 — супернатант культуральної рідини, для одержання якого постферментаційну культуральну рідину центрифугували упродовж 45 хв (5000 g) для осадження біомаси;

препарат 2 — розчин ПАР, виділених з супернатанту (препарат 1) екстракцією сумішшю Фолча, як кописано вище. Сухий залишок ПАР перерозчиняли в стерильному фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,0) до вихідного об'єму.

Дослідження впливу ПАР на руйнування біоплівки здійснювали, як описано у [9]. Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) для бактерій або рідкого сусла (для дріжджів) 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 чи рідкого сусла 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 ПАР різної концентрації. У контрольні варіанти (лунки)

замість препаратів ПАР вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води і визначали кількість адгезованих клітин спектрофотометричним методом. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшету.

Всі досліди проводили в трьох повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становило від 3 до 5. Статистичну обробку експериментальних даних проводили, як описано раніше [7]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. У [10] нами було встановлено залежність антимікробної активності ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 від тривалості культивування продуцента на різних вуглецевих субстратах. Так, поверхнево-активні речовини, синтезовані упродовж 7 діб на рафінованій і відпрацьованій соняшникової олії, виявилися ефективнішими антимікробними агентами щодо фітопатогенних бактерій, ніж ПАР, утворювані на 5 добу культивування продуцента на цих субстратах. Збільшення з 5 до 7 діб тривалості вирощування.

N. vaccinii ІМВ В-7405 як на очищеному, так і технічному гліцерині супроводжувалося синтезом ПАР, антимікробна активність яких щодо більшості досліджуваних тест-культур знижувалася у 1,5—2 рази. У той же час дослідження, наведені в [6], показали, що збільшення тривалості культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на очищеному гліцерині до 7 діб супроводжувалося синтезом ПАР, обидва препарати яких (супернатант, розчин ПАР) руйнували біоплівку *E. coli* ІЕМ-1 на 72—80% тільки за найнижчих концентрацій (8,75—17,5 мкг/мл). Збільшення концентрації ПАР у таких препаратах супроводжувалося зниженням ступеня руйнування біоплівки до 22—59%. Ці результати ми пояснювали тим, що під час культивування штаму ІМВ В-7405 з 5-ї по 7-му добу синтезуються не тільки ПАР, а й інші метаболіти, що можуть маскувати їх дію як деструкторів біоплівки.

У зв'язку з цим ми досліджували залежність ступеня руйнування біоплівок за дії ПАР від тривалості культивування штаму ІМВ В-7405.

У табл. 1 наведено дані щодо деструкції біоплівок за наявності ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих на очищеному гліцерині упродовж 5 і 7 діб.

Таблиця 1. Вплив тривалості культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на очищеному гліцерині на здатність ПАР руйнувати бактеріальні та дріжджові біоплівки

Тривалість культивування, діб	Препарат	Концентрація ПАР, мкг/мл	Руйнування біоплівки, %		
			<i>B. subtilis</i> БТ-2	<i>Pseudomonas</i> sp. М-2	<i>C. albicans</i> Д-6
5	розчин ПАР	140	57	60	27
		280	51	54	22
	супернатант	140	53	52	21
		280	51	52	20
7	розчин ПАР	140	36	56	20
		280	34	52	18
	супернатант	140	29	52	16
		280	23	48	15

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

Зазначимо, що на відміну від *E. coli* IEM-1, руйнування біоплівки якої на 70—80% досягалося за низьких концентрацій ПАР штаму ІМВ В-7405 [6], деструкція біоплівок інших бактеріальних тест-культур (*B. subtilis* БТ-2 і *Pseudomonas* sp. М-2) на рівні 50—60% спостерігалася за вищих на порядок концентрацій поверхнево-активних речовин (табл. 1). Причому ступінь руйнування біоплівки *Pseudomonas* sp. М-2 залишався практично однаковим, незалежно від ступеня очищення препарату (супернатант, розчин ПАР), концентрації ПАР і тривалості вирощування продуцента, у той час як деструкція біоплівки *B. subtilis* БТ-2 суттєво (на 20—30%) знижувалася за наявності ПАР, синтезованих упродовж тривалішого часу культивування продуцента.

Схожі закономірності спостерігали щодо деструкції біоплівки *C. albicans* Д-6, але при цьому ступінь руйнування був більш ніж у два рази нижчим за бактеріальні тест-культури, а різниця між деструкцією цієї біоплівки за наявності ПАР, синтезованих за 5 і 7 діб, була значно меншою і становила всього 4—7% (див. табл. 1).

На наступному етапі аналізували вплив ПАР, утворюваних *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відходах виробництва біодизелю. Оскільки концентрація ПАР, синтезованих на гліцерині різного ступеня очищення, виявилася різною (табл. 2), для досліджень деструкції біоплівок препарати розводили до однакової концентрації ПАР (140—280 мкг/мл, табл. 3).

Таблиця 2. Синтез ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю

Субстрат для синтезу ПАР	Тривалість культивування, діб	Концентрація ПАР, г/л
Очищений гліцерин	5	2,0±0,10
	7	2,2±0,11
Відходи виробництва біодизелю	5	4,4±0,22
	7	4,5±0,23

Дані, наведені у табл. 3, засвідчують, що ступінь руйнування біоплівок бактеріальних тест-культур за дії супернатантів, одержаних з культуральної рідини після вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відходах виробництва біодизелю, є дещо нижчим порівняно з використанням розчинів відповідних ПАР, проте (на відміну від культивування на очищеному гліцерині) збільшення тривалості культивування продуцента супроводжувалося утворенням препаратів, за наявності яких деструкція біоплівок підвищувалася практично до показників, встановлених для ПАР, утворюваних упродовж 5 діб на очищеному гліцерині (див. табл. 1). Оскільки концентрація ПАР, синтезованих упродовж 5 і 7 діб на відходах виробництва біодизелю, є практично однаковою (див. табл. 2), можна припустити, що до кінця культивування на цьому субстраті змінюється співвідношення складових комплексу ПАР в результаті їх взаємоперетворень, наприклад, за рахунок глікозилювання чи амінування нейтральних ліпідів.

У той же час ступінь руйнування дріжджової біоплівки практично не залежав від ступеня очищення препарату (супернатант, розчин ПАР), концентрації ПАР і тривалості вирощування продуцента на відходах виробництва біодизелю (див. табл. 3).

Таблиця 3. Руйнування біоплівки за наявності ПАР, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відходах виробництва біодизелю

Тривалість культивування, дб	Препарат	Концентрація ПАР, мкг/мл	Руйнування біоплівки, %			
			<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>B. subtilis</i> БТ-2	<i>Pseudomonas</i> sp. М-2	<i>C. albicans</i> Д-6
5	розчин ПАР	140	40	40	46	24
		280	33	32	40	23
	супернатант	140	28	30	25	21
		280	20	26	20	19
7	розчин ПАР	140	43	55	60	25
		280	38	53	52	24
	супернатант	140	35	31	50	22
		280	27	29	29	20

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

Зазначимо, що інформація щодо біологічних властивостей мікробних ПАР, синтезованих на промислових відходах, є нечисленною. Разом з тим наявні відомості про використання для руйнування біоплівки поверхнево-активних речовин, синтезованих на традиційних субстратах. Порівняння одержаних нами результатів з даними літератури наведено у табл. 4.

Таблиця 4. Порівняльна характеристика різних мікробних ПАР щодо їх впливу на біоплівки

Субстрат для синтезу ПАР	Продуцент ПАР	Концентрація ПАР, мг/мл	Тест-культури	Ступінь руйнування біоплівки, %	Джерело
1	2	3	4	5	6
Відходи виробництва біодизелю	<i>Nocardia vaccinii</i> ІМВ В-7405	0,14	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	28–43	Ця стаття
			<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	26–55	
			<i>Pseudomonas</i> sp. М-2	20–60	
			<i>Candida albicans</i> Д-6	19–25	
Рафінована кукурудзяна олія	<i>Corynebacterium xerosis</i> NS5	100	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	66	[11]
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	30	
Очищений гліцерин	<i>Lactobacillus jensenii</i> 25258 та <i>L. rhamnosus</i> 7469	50	<i>Escherichia coli</i> EC433	75	[12]
Очищений гліцерин	<i>Enterococcus faecium</i> MRTL 9	1,56	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	41	[13]
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	40	
			<i>Candida albicans</i> MTCC 183	20	

1	2	3	4	5	6
Очищений гліцерин	<i>Candida sphaerica</i> UCP 0995	10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	80	[14]
Сахароза	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AR2	1	<i>Candida albicans</i> MTCC 183	54	[15]
Очищений гліцерин	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	0,4	<i>Bacillus subtilis</i> ВВК006	80	[16]
Глюкоза	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027			60	

Дані табл. 4 засвідчують, що в літературі представлені відомості про руйнування біоплівки умовно патогенних мікроорганізмів за впливу мікробних ПАР, синтезованих на таких субстратах, як очищений гліцерин, вуглеводи та рафінована олія. При цьому відсоток руйнування біоплівки культур є у деяких випадках більший, ніж за наявності ПАР, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відходах виробництва біодизелю, проте концентрації ПАР, за яких відбувалася деструкція, були на порядки вищими, ніж встановлені нами у пропонуваному дослідженні для ПАР штаму ІМВ В-7405.

Так, наприклад, за дії ПАР *Corynebacterium xerosis* NS5 у концентрації 100 мг/мл, синтезованих на рафінованій кукурудзяній олії, спостерігали руйнування біоплівки *E. coli* та *P. aeruginosa* на 66 та 30% відповідно [11]. У разі використання високої (1,56 мг/мл) концентрації ПАР *E. faecium* MRTL 9, одержаних на очищеному гліцерині, деструкція біоплівки *E. coli*, *P. Aeruginosa* та *C. albicans* становила 41, 40 та 20% відповідно [13].

Висновок

Отже, незважаючи на нижчий ступінь деструкції бактеріальних біоплівок за наявності ПАР, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відходах виробництва біодизелю (порівняно з використанням ПАР, одержаних на очищеному гліцерині), ці показники (руйнування до 50—60% біоплівок при концентрації ПАР 140 мкг/мл) є порівнянними (а в деяких випадках і перевищують) з визначеними для відомих у світі мікробних поверхнево-активних речовин.

Крім того, одержані нами результати вказують, що заміна очищеного гліцерину в середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відходи виробництва біодизелю дає змогу, по-перше, підвищити рентабельність такого виробництва, по-друге, утилізувати токсичні відходи, по-третє, здешевити процес біосинтезу ПАР, по-четверте, одержати цільовий продукт з високою здатністю до руйнування біоплівок умовно патогенних і патогенних мікроорганізмів.

Залежність біологічних властивостей мікробних поверхнево-активних речовин від тривалості процесу і «якості» використовуваного субстрату засвідчують необхідність проведення досліджень з впливу умов культивування продуцентів на властивості цільового продукту.

Література

1. Maganaa M., Seretia C., Ioannidisa A., Mitchell C. A., Balle A. R., Magiorkinis E., Chatzipanagioutou S., Hamblin M. R., Hadjifrangiskou M., Tegos G. P. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018, 31(3). pii: e00084-16. doi: 10.1128/CMR.00084-16.
2. Jałowiecki Ł., Żur J., Chojniak J., Ejhed H., Plaza G. Properties of antibiotic-resistant bacteria isolated from onsite wastewater treatment plant in relation to biofilm formation. *Curr. Microbiol.* 2018, 75(5): 639–649. doi: 10.1007/s00284-017-1428-2.
3. van Tilburg Bernardes E., Lewenza S. Reckseidler-Zenteno S. Current research approaches to target biofilm infections. *Postdoc J.* 2015, 3(6): 36–49.
4. Banat I.M., De Rienzo M.A., Quinn G.A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98(24): 9915–9929. doi: 10.1007/s00253-014-6169-6.
5. Garlapati V.K., Shankar U., Budhiraja A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnol. Rep. (Amst).* 2015, 9: 9–14. doi: 10.1016/j.btre.2015.11.002.
6. Pirog T., Nikitiuk L., Kondrashevska K., Kluchka I. Influence of surfactants synthesized under different cultivation conditions of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on *Escherichia coli* IEM-1 biofilm destruction. *Scientific Works of NUFT.* 2017, 23(2): 23–30. Ukrainian.
7. Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Maschenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *Food Bioprod. Proces.* 2015, 93(1): 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.003>.
8. Pirog T., Nikitiuk L., Sidor I., Paliichuk O., Petrenko N. Antimicrobial activity of surfactants synthesized by *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *R. erythropolis* IMV Ac-5017 and *N. vaccinii* IMV B-7405 on industrial waste. *Scientific Works of NUFT.* 2017, 23(5, Pt 2): 8–16. doi:10.24263/2225-2924-2017-23-5-2-3. Ukrainian.
9. Gomes M-Z.V., Nitschke M. Evaluation of rhamnolipids surfactants as agents to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polystyrene surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012, 49(1): 960–965.
10. Pirog T., Nikitiuk L., Tymoshuk K. Influence of the duration of cultivation on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants. *Scientific Works of NUFT.* 2016, 22(5): 25–32. Ukrainian.
11. Dalilia D., Aminib M., Faramarzi M. A., Fazelia M. R., Khoshayanda M. R., Samadi N. Isolation and structural characterization of Coryxin, a novel cyclic lipopeptide from *Corynebacterium xerosis* NS5 having emulsifying and anti-biofilm activity. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2015, 135: 425–432. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.005.
12. Sambanthamoorthy K., Feng X., Patel R., Patel S., Paranavitana C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol.* 2014, 14:197. doi: 10.1186/1471-2180-14-197.
13. Sharma D., Saharan B. S., Chauhan N., Procha S., Lal S. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *Springerplus.* 2015, 4:4. doi: 10.1186/2193-1801-4-4.
14. Padmavathi A. R., Pandian S. K. Antibiofilm activity of biosurfactant producing coral associated bacteria isolated from gulf of mannar. *Indian J. Microbiol.* 2014, 54(4): 376–382. doi: 10.1007/s12088-014-0474-8.
15. Rautela R., Singh A.K., Shukla A., Cameotra S.S. Lipopeptides from *Bacillus strain* AR2 inhibits biofilm formation by *Candida albicans*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2014, 105(5): 809–821. doi: 10.1007/s10482-014-0135-2
16. De Rienzo M.A.D., Martin P.J. Effect of mono and di-rhamnolipids on biofilms preformed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Curr. Microbiol.* 2016, 73(2): 183–189. doi: 10.1007/s00284-016-1046-4.