

ВПЛИВ БЕЗКЛІТИННИХ СУПЕРНАТАНТІВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*, АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ, ФРУКТОЗИ, СОРБІТУ, КСИЛІТУ ТА СТЕВІЇ НА ПРИРІСТ БІОМАСИ УМОВНО- ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Книш О. В., Мартинов А. В.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова Національної академії медичних наук
України»

Bifidobacterium bifidum – типовий представник роду біфідобактерій. В результаті ферментації вуглеводів ці гетероферментативні бактерії продукують біологічно активні метаболіти, що пригнічують ріст потенційних патогенів: органічні кислоти (в основному – оцтову та молочну, значно в меншій кількості – мурашину та бурштинову), деривати поліненасичених жирних кислот, етанол, пероксид водню, діацетил та інші [1, 2]. Більшість штамів *B. bifidum* здатні ферментувати лактозу, фруктозу, галактозу, амілозу, сахарозу, мелібіозу, глюкозамін, амілопектин, деякі штами ферментують мальтозу, пектин, ксилан. Деградація глюкози відбувається виключно через фруктозо-6-фосфатний шунт. Відомо, що біфідобактерії виду *B. bifidum* не ферментують поліоли: маніт, гліцерин та сорбіт [2]. Але відсутність ферментів деградації не виключає можливості хімічної модифікації молекул поліолів під дією ферментів бактерій, в результаті якої ймовірно стає поява у них нових властивостей. Комбінаторний біосинтез вважають перспективним шляхом пошуку нових протимікробних речовин [3]. Прикладом комбінаторного біосинтезу є перетворення ферментами бактерій *Lactobacillus reuteri* поліолу гліцерину в реутерин, речовину з широким спектром протимікробної дії [4]. Крім того, існує синергізм дії деяких пробіотичних бактерій та поліолів. Наприклад, незважаючи на нездатність *Lactobacillus plantarum* ферментувати ксиліт, комбіноване застосування в експерименті *in vitro* цих лактобактерій з 5 % ксилітом повністю припиняло проростання *Clostridium difficile* [5].

Властивості сорбіту та ксиліту дозволяють віднести їх до пребіотиків – неперетравлюваних харчових компонентів, які здатні покращити здоров'я людини за рахунок вибіркової стимуляції росту та активності корисних бактерій кишечника [5, 6, 7]. Дослідженнями *in vivo* встановлено, що вживання сорбіту призводить до модифікації складу і активності кишкової мікрофлори: вибіркового збільшення вмісту лактобактерій та значного підвищення рівня бутирату в кишечнику [6]. Неперетравлюваний спиртовий вуглевод ксиліт ферментується в кишечнику представниками роду *Anaerostipes* та іншими цукролітичними бактеріями з утворенням важливих для

здоров'я кишечника біологічно активних метаболітів: органічних кислот, газів (водню, метану, діоксиду вуглецю) та етанолу [5, 7]. Найбільш поширені види лакто- та біфідобактерій не здатні ферментувати ксиліт та сорбіт, але вплив присутності цих поліолів в середовищі росту кисломолочних бактерій на їх функціональну активність і властивості метаболітів потребує вивчення.

Стевія – натуральний підсолоджувач і цукрозамінник. Використання стевії як харчової добавки супроводжується корисними для здоров'я ефектами: гіпоглікемічним, антиоксидантним, протизапальним, імуномодуляторним. Але за концентрації 0,2 – 2,6 мг/мл глікозиди стевії пригнічують ріст і кислотоутворення *Lactobacillus reuteri* [8]. Вплив стевії на протимікробну активність представників корисної мікрофлори кишечника по відношенню до потенційних патогенів залишається недостатньо вивченим.

Аскорбінова кислота є потужним антиоксидантом. Завдяки здатності захищати інші молекули і макромолекули від окислення вона може зберігати або посилювати активність деяких речовин [9]. Відомо, що аскорбінова кислота володіє власною протимікробною активністю по відношенню до деяких умовно-патогенних мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae* [9, 10, 11]. Крім того, нашими попередніми дослідженнями виявлено ефект потенціювання протимікробної активності безклітинних екстрактів *L. reuteri* аскорбіновою кислотою та хімічну модифікацію аскорбінової кислоти в процесі культивування *L. reuteri* у дезінтеграції власних клітин [12]. Чи є ефект потенціювання та хімічна модифікація аскорбінової кислоти специфічними для *L. reuteri*, належить дослідити.

Мета роботи – провести порівняльне вивчення впливу розчинів аскорбінової кислоти, фруктози, стевії, ксиліту і сорбіту та супернатантів, отриманих шляхом культивування *B. bifidum* у власному дезінтеграції з додаванням зазначених речовин, на добовий приріст умовно-патогенних мікроорганізмів.

Матеріали і методи

Пробіотичний штам *B. bifidum* 1 виділяли з біологічно активної добавки «Біфідумбактерин-Біофарма» (ЗАТ Біофарма, Україна). Ліофілну масу піддавали регідратації і відновленню шляхом культивування впродовж 20 - 24 годин за температури 37 °С у тіогліколевому середовищі (Biolife, Італія). Після перевірки чистоти культури мікробну масу трічі відмивали від поживного середовища і готували суспензію клітин у 0,9 % розчині натрію хлориду. Суспензію піддавали дезінтеграції методом термоцикловання [13]. Дезінтеграції розділяли на 6 порцій. Перша порція (контрольна) залишалася без змін. До решти порцій дезінтеграції додавали

аскорбінову кислоту у кінцевій концентрації 5 мг/мл (BbAsc), стевію (BbSt), сорбіт (BbSor), ксиліт (BbXyl) та фруктозу (BbFr) у концентрації 30 мг/мл. В отримані дезінтеграти вводили суспензію свіжовиділених біфідобактерій з оптичною густиною 10 одиниць за шкалою МакФарланда у співвідношенні 9:1 і культивували за температури 37 °C та анаеробних умов впродовж 72 годин.

Одержані культури центрифугували впродовж 30 хвилин при 1000 г. Для подальших досліджень використовували супернатанти та розчини дослідних речовин у стерильному 0,9 % розчині натрію хлориду у тих же концентраціях, в яких вони додавалися до дезінтегратів.

Як тест-культури використовували референтні штами: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Тест-культури культивували впродовж 24 годин при 37 °C на жовтково-сольовому, поживному агарі (Biolife, Італія) та середовищі Ендо (HiMedia, Індія). Після перевірки чистоти з культур були приготовані інокуляти (суспензії з оптичною густиною 0,5 одиниць за шкалою МакФарланда), які розводили 1:10 стерильним 0,9 % розчином натрію хлориду.

Вивчення впливу супернатантів та дослідних речовин на добовий приріст біомаси тест-культур проводили за методом, описаним раніше [14]. В інкубаційному середовищі вміст дослідних супернатантів та розчинів речовин складав 30 % об, а концентрація тест-культур $\sim 10^6$ КУО/мл. Оптичну густину (ОГ) вмісту лунок вимірювали при 578 нм за допомогою мікропланшетного рідера «LisaScanEM» («ErbaLachemas.r.o.»), Чеська Республіка). Розраховували індекси пригнічення (або стимуляції) добового приросту біомаси тест-культур за формулою: $IP (IC) = \frac{\Delta OG_d - \Delta OG_k}{\Delta OG_k} \times 100\%$, де ΔOG_d і ΔOG_k – зміни

оптичної густини дослідних і контрольних зразків протягом 24 годин, відповідно.

Експерименти проводили тричі. Кожен зразок тестували в трьох повторах. Визначали середні значення отриманих показників зі стандартними відхиленнями ($\bar{x} \pm SD$). Отримані дані піддавали статистичній обробці за допомогою програми Excel 2003 шляхом проведення одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) та наступного множинного порівняльного аналізу з використанням критерію Стьюдента з поправкою Бонферроні. Відмінності між отриманими показниками вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

Представлені на рис. 1 дані показують: як супернатанти, отримані після культивування *B. bifidum* у дезінтеграті з додаванням сорбіту (BbSor) та стевії (BbSt), так і самі зазначені речовини (Sor та St) за концентрації 30 мг/мл не мали статистично достовірного впливу на добовий приріст стафілококів. Спостерігалася тенденція до зниження добового приросту стафілококів за впливу стевії (St) і безклітинного супернатанту BbSt (19,6 %, $p = 0,06$ та 20,6 %, $p = 0,05$, відповідно). Супернатанти, отримані після культивування *B. bifidum* в присутності ксиліту (BbXyl) та фруктози (BbFr), викликали пригнічення добового приросту стафілококів (BbXyl: ІП = 26,1 %, BbFr: ІП = 34,6 %) на рівні розчинів ксиліту (Xyl) та фруктози (Fr) аналогічної концентрації (Xyl: ІП = 28,4 %, Fr: ІП = 30,9 %). Аскорбінова кислота викликала пригнічення добового приросту біомаси стафілококів на рівні 42 %. Супернатант, отриманий після культивування *B. bifidum* в присутності аскорбінової кислоти (BbAsc), пригнічував добовий приріст стафілококів на 78 %.

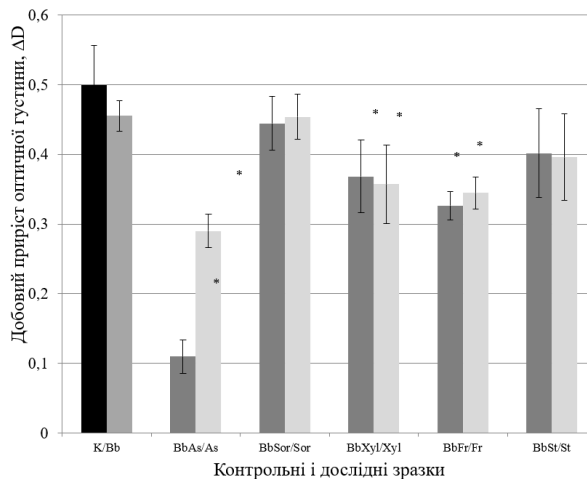


Рис. 1. Вплив супернатантів культури *B. bifidum*, що культивувалася у дезінтеграті з додаванням дослідних речовин: аскорбінової кислоти (BbAsc), сорбіту (BbSor), ксиліту (BbXyl), фруктози (BbFr), стевії (BbSt), дезінтеграту *B. bifidum* (Bb) та дослідних речовин на добовий приріст біомаси *S. aureus*. Примітки: * – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем (K), $p < 0,05$.

Супернатанти BbXyl, BbFr, BbSt та розчини Fr і St не мали значного впливу на добовий приріст біомаси кишкової палички. Розчин Xyl викликав пригнічення добового приросту культури на 20,9 %. Збільшення добового приросту кишкової палички

спостерігалось за присутності в інкубаційному середовищі супернатанта BbSor (IC = 43,9 %) та розчину Sor (IC = 34,5 %). Аскорбінова кислота за умов експерименту пригнічувала добовий приріст кишкової палички на 35 %, а супернатант BbAsc – на 52 %.

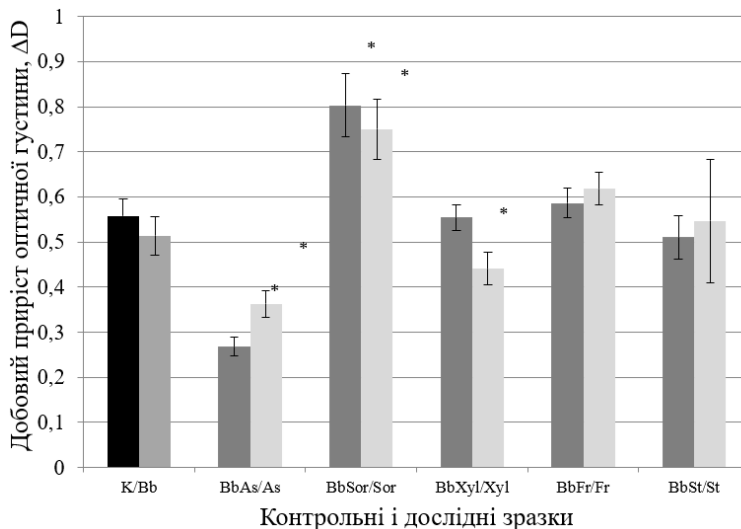


Рис. 2. Вплив супернатантів культури *B. bifidum*, що культивувалася у дезінтеграції з додаванням дослідних речовин: аскорбінової кислоти (BbAsc), сорбіту (BbSor), ксиліту (BbXyl), фруктози (BbFr), стевії (BbSt) та дослідних речовин на добовий приріст біомаси *E. coli*. Примітки: * – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем (K), $p < 0,05$.

Супернатанти BbXyl та BbSt, як і розчини Xyl та St не впливали на добовий приріст біомаси *P. aeruginosa*. Збільшення приросту біомаси синьогнійної палички за впливу супернатантів BbSor (IC = 26,4 %) та BbFr (IC = 19,8 %) було на рівні збільшення приросту

культури в присутності відповідних розчинів поліолу Sor (IC = 28 %) та вуглеводу Fr (IC = 23,7 %). Супернатант BbAsc викликав більше пригнічення ($\Pi = 45$ %) приросту біомаси *P. aeruginosa*, ніж розчин Asc ($\Pi = 38$ %).

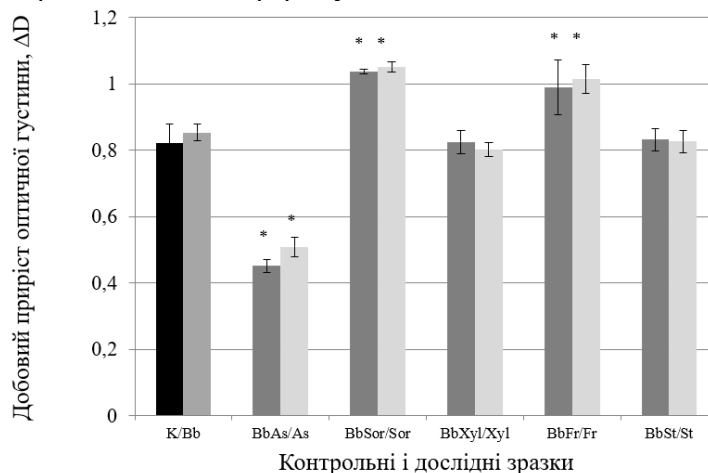


Рис. 3. Вплив супернатантів культури *B. bifidum*, що культивувалася у дезінтеграції з додаванням дослідних речовин: аскорбінової кислоти (BbAsc), сорбіту (BbSor), ксиліту (BbXyl), фруктози (BbFr), стевії (BbSt) та дослідних речовин на добовий приріст біомаси *P. aeruginosa*. Примітки: * – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем (K), $p < 0,05$.

Аналіз хроматограм супернатанту культури *B. bifidum*, що культивувалася у дезінтеграції з додаванням

аскорбінової кислоти (BbAsc), та 0,5 % аскорбінової кислоти у фізіологічному розчині натрію хлориду (рис. 4) свідчить про відсутність модифікаційних змін

аскорбінової кислоти в процесі культивування *B. bifidum*.

Обговорення

Серед дослідних речовин лише стевія не мала значного впливу на приріст біомаси жодної з тест-культур як у вигляді розчину з кінцевою концентрацією 30 мг/мл, так і в складі супернатанта культури *B. bifidum*. Фруктоза у кінцевій концентрації 30 мг/мл мала такий же вплив на ріст тест-культур, як і супернатант культури *B. bifidum* після культивування пробіотика з фруктозою: пригнічувала ріст стафілокока, стимулювала ріст *P. aeruginosa* і не впливала на ріст *E. coli*. При цьому слід зазначити, що як біфідобактерії *B. bifidum*, так і всі дослідні тест-культури здатні ферментувати фруктозу [2, 15, 16, 17]. Ксиліт у кінцевій концентрації 30 мг/мл не впливав на приріст біомаси *P. aeruginosa*, але пригнічував ріст *E. coli* та *S. aureus*. Отримані результати лише частково збігаються з даними інших дослідників, які не виявили бактерицидної або бактеріостатичної дії ксиліту по

відношенню до *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* (ATCC 9027 і клінічного ізоляту) та *E. coli* (ATCC 8739 і ентеропатогенного клінічного ізоляту) [18, 19, 20]. За результатами досліджень зазначених авторів ксиліт пригнічував адгезивну здатність тест-культур. Інші дослідники повідомили, що ксиліт пригнічував біоплівкоутворення та продукцію факторів патогенності *P. aeruginosa* [21, 22]. Протимікробна активність ксиліту відносно шкірних патогенів була задокументована головним чином в поєднанні з іншими сполуками [5]. Супернатант культури *B. bifidum*, що культивувалася в присутності ксиліту, пригнічував приріст біомаси *S. aureus* і не впливав на приріст біомаси решти тест-культур. Сорбіт та супернатант культури *B. bifidum*, що культивувалася в присутності цього поліолу, однаково впливали на приріст біомаси тест-культур: не впливали на ріст *S. aureus*, але стимулювали ріст *E. coli* та *P. aeruginosa*. Серед дослідних тест-культур лише *E. coli* здатна ферментувати сорбіт [17].

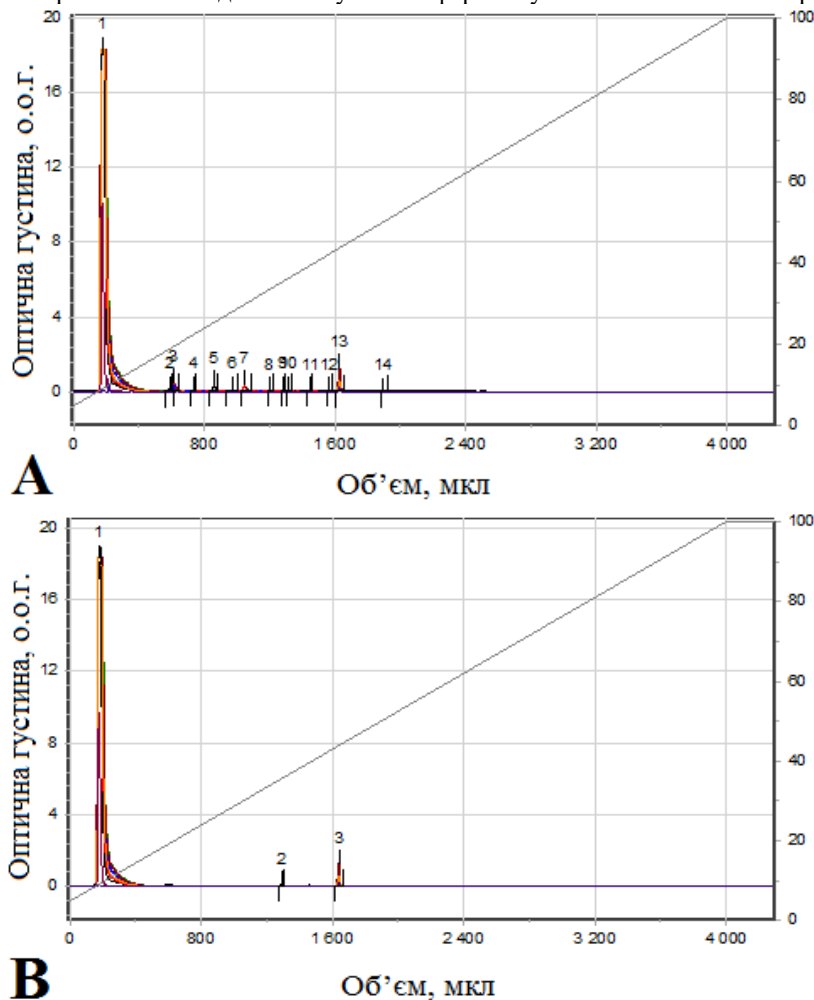


Рис. 4. Хроматограми безклітинного супернатанту BbAsc (A) та розчину аскорбінової кислоти (Asc).

Зважаючи на те, що *B. bifidum* не ферментує сорбіт, стимуляція росту кишкової палички могла бути спричинена сорбітом як енергетичним субстратом.

Природа стимуляторного впливу сорбіту на *P. aeruginosa* залишається нез'ясованою. Єдиною речовиною, яка значно пригнічувала приріст біомаси всіх дослідних тест-культур, була аскорбінова кислота.

Більш виражене пригнічення добового приросту біомаси тест-культур під дією супернатанту культури *B. bifidum*, що культивувалася в дезінтеграції з додаванням аскорбінової кислоти, порівняно з самою аскорбіновою кислотою можна пояснити синергетичною дією аскорбінової кислоти та інгібіторних сполук, що продукуються *B. bifidum* в процесі культивування.

Висновки

Серед досліджених речовин лише аскорбінова кислота викликала значне пригнічення приросту біомаси всіх дослідних тест-культур. Безклітинний супернатант культури *B. bifidum*, що культивувалася у дезінтеграції з додаванням аскорбінової кислоти, спричиняв більш виражене пригнічення росту тест-культур, ніж аскорбінова кислота. Відсутність на хроматограмі ознак модифікаційних змін аскорбінової кислоти в безклітинному супернатанті *B. bifidum* є свідченням того, що більш значний інгібіторний ефект супернатанта зумовлений синергетичною дією аскорбінової кислоти та інгібіторних сполук, що продукуються *B. bifidum* в процесі культивування. Решта досліджених речовин показали різний характер впливу на приріст біомаси тест-культур. Застосування *B. bifidum* як системи біохімічної модифікації, а ксиліту, сорбіту, фруктози та стевії як попередників для отримання нових протимікробних речовин шляхом комбінаторного біосинтезу виявилось недостатньо ефективним.

The effect of *Bifidobacterium bifidum* cell-free supernatants, ascorbic acid, fructose, sorbitol, xylitol and stevia on the daily biomass growth of opportunistic microorganisms

Knysch O.V., Martynov A.V.

Introduction. The use of probiotic bacteria as biotransformer system is a promising way to obtain new derivatives of known substances with antimicrobial or other beneficial activity. The aim of the research was to investigate the effect of the *Bifidobacterium bifidum* cell-free supernatants, obtained by cultivation of bifidobacteria in their own disintegrate supplemented with ascorbic acid (BbAsc), fructose (BbFr), sorbitol (BbSor), xylitol (BbXyl) or stevia (BbSt) and the substances themselves (Asc, Sor, Xyl or St) on the growth of opportunistic microorganisms.

Material & methods. The effect of the studied supernatants and substances on the daily biomass growth of the test cultures was investigated by spectrophotometry using a 96-well polystyrene microtiter plates and a «LisaScanEM» spectrophotometer («ErbaLachemas.r.o.», Czech Republic). Reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as a test cultures. The final concentration of the studied supernatants and substances in the incubation medium was 30% vol, and the final concentration of bacterial cells was $\sim 10^6$ CFU/ml.

Inhibition (II) or stimulation (SI) indices of the daily biomass growth of test cultures were calculated by the formula $II (SI) = \frac{\Delta Dt - \Delta Dc}{\Delta Dc} \times 100\%$, where ΔDt and ΔDc are the optical density gain of test and control samples.

Results & discussion. Among the studied substances, stevia alone did not affect the daily biomass growth of any of the test cultures, either as in solution with a final concentration of 30 mg/ml or as in a supernatant of *B. bifidum* culture. Fructose at a final concentration of 30 mg/ml had the same effect on test cultures growth as the supernatant of *B. bifidum* culture after probiotic cultivation with fructose: it inhibited staphylococcal growth (Fr: II = 30,9 %, BbFr: II = 34,6 %), stimulated the growth of *P. aeruginosa* (Fr: IS = 23,7 %, BbFr: IS = 19,8 %) and did not affect the growth of *E. coli*. Xylitol at a final concentration of 30 mg/ml did not affect the growth of *P. aeruginosa* biomass, but inhibited the growth of *E. coli* (II = 20,9 %) and *S. aureus* (II = 28,4 %). The supernatant of *B. bifidum*, cultured in the presence of xylitol inhibited the growth of *S. aureus* biomass (II = 26,1 %) and did not affect the growth of the other test cultures. The sorbitol and cell-free supernatant of *B. bifidum* cultured in the presence of this polyol equally influenced the biomass growth of test cultures: had no significant effect on the daily biomass growth of *S. aureus* but stimulated the growth of *E. coli* (BbSor: IS = 43,9 %, Sor: IS = 34,5 %) and *P. aeruginosa* (BbSor: IS = 26,4 %, Sor: IS = 28 %). The only substance that significantly inhibited the biomass growth of all test cultures was ascorbic acid. Cell-free supernatant of *B. bifidum* (BbAsc) cultured in disintegrate supplemented with ascorbic acid caused more pronounced inhibition of the daily biomass growth (*S. aureus* – 78 %, *E. coli* – 52 % and *P. aeruginosa* – 45 %) compared to ascorbic acid (Asc) itself (*S. aureus* – 42 %, *E. coli* – 35 % and *P. aeruginosa* – 38 %). **Conclusion.** Among the studied substances, only ascorbic acid caused significant inhibition of biomass growth of all test cultures. *B. bifidum* cell-free supernatant obtained by cultivation of bifidobacteria in their own disintegrate supplemented with ascorbic acid caused a more severe inhibition of test cultures growth than ascorbic acid itself. The absence of signs of chemical modification of ascorbic acid in the *B. bifidum* cell-free supernatant on the chromatogram indicates that the greater inhibitory effect of this supernatant is due to the synergistic effect of ascorbic acid and the inhibitory compounds produced by *B. bifidum* during cultivation. The other studied substances showed various effects on the daily biomass growth of test cultures. The use of *B. bifidum* as a biotransformer system, and xylitol, sorbitol, fructose and stevia as precursors for the production of new antimicrobials by combinatorial biosynthesis, turned out to be not effective enough.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, cell-free supernatants, ascorbic acid, fructose, sorbitol, xylitol stevia, biomass growth, opportunistic microorganisms

References

1. Sarkar, A., & Mandal, S. (2016). Bifidobacteria – insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research*, 192, 159-171. doi: 10.1016/j.micres.2016.07.001
2. Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-I., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (Eds.). (2012). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Five: The Actinobacteria*, Part A. Springer New York. Pp. 171-206. doi:10.1007/978-0-387-68233-4
3. Ang, E. L., Sun, H., Liu, Z., & Zhao, H. (2015). Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. *Drug Design, Development and Therapy*, 823. doi:10.2147/dddt.s63023
4. Spinler, J. K., Auchtung, J., Brown, A., Boonma, P., Oezguen, N., Ross, C. L., Luna, R. A., Runge, J., Versalovic, J., Peniche, A., Dann, S. M., Britton, R. A., Haag, A., & Savidge, T. C. (2017). Next-generation probiotics targeting *Clostridium difficile* through precursor-directed antimicrobial biosynthesis. *Infection and Immunity*, 85(10). doi:10.1128/iai.00303-17
5. Salli, K., Lehtinen, M. J., Tiihonen, K., & Ouwehand, A. C. (2019). Xylitol's health benefits beyond dental health: a comprehensive review. *Nutrients*, 11(8), 1813. doi:10.3390/nu11081813
6. Sarmiento-Rubiano, L. A., Zúñiga, M., Pérez-Martínez, G., & Yebra, M. J. (2007). Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Research in Microbiology*, 158(8-9), 694–701. doi:10.1016/j.resmic.2007.07.007
7. Lugani, Y., & Sooch, S. (2017). Xylitol, an emerging prebiotic: a review. *International journal of Applied Pharmaceutical and Biological Research*, 2017; 2(2):67-73.
8. Deniņa, I., Semjonovs, P., Fomina, A., Treimane, R., & Linde, R. (2013). The influence of stevia glycosides on the growth of *Lactobacillus reuteri* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 58(3), 278–284. doi:10.1111/lam.12187
9. Kallio, J., Jaakkola, M., Mäki, M., Kilpeläinen, P., & Virtanen, V. (2012). Vitamin C inhibits *Staphylococcus aureus* growth and enhances the inhibitory effect of Quercetin on growth of *Escherichia coli in vitro*. *Planta Medica*, 78(17), 1824–1830. doi:10.1055/s-0032-1315388
10. Panda, L. (2018). Antibacterial activity of ascorbic acid: pH effect, specific action or both? In *Abstracts of papers of the American Chemical Society (Vol. 255)*. 1155 16TH ST, NW, Washington, DC 20036 USA: Amer Chemical Soc. doi: 10.13140/RG.2.2.22321.48482
11. Verghese R.J., Mathew S.K., David A. (2017). Antimicrobial activity of Vitamin C demonstrated on uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Current Research in Scientific Medicine*, 3(2), 88. doi:10.4103/jcrsm.jcrsm_35_17
12. Knysh O.V., Martynov A.V. (2020). Potentiation of the antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cell-free extracts by ascorbic acid. *Medical Perspectives*. 25(1), DOI: 10.26641/2307-0404.2020.1.200393
13. Knysh, O. V., Isaenko, O. Y., Babych, E. M., Kompaniets, A. M., Pakhomov, O. V., Polyanska, V. P., Zachepylo, S. V., & Danilova, I. S. (2018). Antimicrobial activity of bifidobacteria derivatives after storage in a frozen state. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 28(3), 237-248. doi: 10.15407/cryo28.03.237doi:10.15407/cryo28.03.237
14. Knysh O.V., Martynov A.V., Voyda Yu.V., Babych Ye.M. (2020). The influence of polyols on the bacteriotropic properties of the *Lactobacillus reuteri* cell-free superants. *Annals of Mechnikov's Institute*, 1, doi: 10.5281/zenodo.3726635
15. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer K.-H., & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media. Pp. 392-421.
16. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., & Garrity, G. M. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part B. The Gammaproteobacteria*. Springer-Verlag US. Pp. 323-379, 607-725. doi:10.1007/0-387-28021-9
17. Siegrist, J. (2011). *Differentiation of Escherichia coli from coliforms*. AnalytX. St. Louis: Sigma-Aldrich.
18. Ferreira, A. S., Barbosa, N. R., Júnior, D. R., & da Silva, S. S. (2009). *In vitro* mechanism of xylitol action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 505-509. doi:10.1142/9789812837554_0105
19. Sousa, L. P. de, Silva, A. F. da, Calil, N. O., Oliveira, M. G., Silva, S. S. da, & Raposo, N. R. B. (2011). *In vitro* inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by Xylitol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5), 877–884. doi:10.1590/s1516-89132011000500004
20. Silva, A. F. da, Suzuki, É. Y., Ferreira, A. S., Oliveira, M. G., Silva, S. S. da, & Raposo, N. R. B. (2011). *In vitro* inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by Xylitol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2), 235–241. doi:10.1590/s1516-89132011000200003
21. Dowd, S. E., Sun, Y., Smith, E., Kennedy, J. P., Jones, C. E., & Wolcott, R. (2009). Effects of biofilm treatments on the multi-species Lubbock chronic wound biofilm model. *Journal of Wound Care*, 18(12), 508–512. doi:10.12968/jowc.2009.18.12.45608
22. Mengoni, E., Dugour, A., Vojnov, A., & Figueroa, J. (2013). Xylitol affects production of virulence factors and biofilm in *Pseudomonas aeruginosa*; effects on respiratory epithelium inflammation." *In vitro* studies. *European Respiratory Journal*, 42 (Suppl 57), P2109.