

Влияние поверхностно-активных веществ на формирование биоплёнки штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-10353

© 2020. А. В. Гильдебрант¹, м. н. с.,
 Л. И. Домрачева^{2,3}, д. б. н., профессор, в. н. с., В. А. Выростков¹, магистр,
 И. С. Сазыкин¹, к. б. н., в. н. с., Е. М. Кудеевская¹, м. н. с.,
 М. А. Сазыкина¹, д. б. н., в. н. с., профессор,
¹Южный федеральный университет,
 344090, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, д. 194/2,
²Вятская государственная сельскохозяйственная академия,
 610017, Россия, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 133,
³Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
 167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,
 e-mail: gildebrant@sfedu.ru, dli-alga@mail.ru, vyrostkov@sfedu.ru,
 issa@sfedu.ru, kudeevskaya@sfedu.ru, samara@sfedu.ru

Широкое бытовое и промышленное применение поверхностно-активных веществ (ПАВ) приводит к их значительному содержанию в сточных водах и, как следствие, к загрязнению окружающей среды. В данном исследовании рассмотрено влияние индивидуальных ПАВ (додецилсульфат натрия, лаурилсаркозинат натрия) и синтетических моющих средств (СМС) на их основе на процесс формирования биоплёнки штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-10353 в концентрациях 0,001–0,5%. Для определения интенсивности образования биоплёнки использован метод окрашивания кристаллическим фиолетовым. Для оценки количества жизнеспособных бактерий в составе биоплёнки использован метод окрашивания флуоресцеин диацетатом. Показано, что различные ПАВ и СМС по-разному влияют на биоплёнкообразование. В зависимости от концентрации, ПАВ способны как подавлять, так и стимулировать образование бактериальных биоплёнок. Полученные данные показывают, что синергетические и интерференционные взаимодействия всех компонентов СМС, вероятно, могут играть большую роль, и по действию индивидуальных ПАВ, входящих в его состав, невозможно судить об антибактериальной и антибиоплёночной активности СМС в целом.

Ключевые слова: додецилсульфат натрия, лаурилсаркозинат натрия, синтетическое моющее средство, интенсивность биоплёнкообразования, детергент, бактериальное обрастание.

The influence of surface-active substances on biofilm formation by the *Acinetobacter calcoaceticus* VKPM B-10353 strain

© 2020. A. V. Gildebrant¹ ORCID: 0000-0001-9308-2022,
 L. I. Domracheva^{2,3} ORCID: 0000-0002-7104-3337, V. A. Vyrostkov¹ ORCID: 0000-0001-8536-3297,
 I. S. Sazykin¹ ORCID: 0000-0002-0864-1473, E. M. Kudeevskaya¹ ORCID: 0000-0002-1928-394X,
 M. A. Sazykina¹ ORCID: 0000-0001-6974-3361,
¹Southern Federal University,
 194/2, Stachki Prospekt, Rostov-on-Don, Russia, 344090,
²Vyatka State Agricultural Academy,
 133, Oktyabrskiy Prospekt, Kirov, Russia, 610017,
³Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Branch of RAS,
 28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,
 e-mail: gildebrant@sfedu.ru, dli-alga@mail.ru, vyrostkov@sfedu.ru,
 issa@sfedu.ru, kudeevskaya@sfedu.ru, samara@sfedu.ru

The vast majority of microorganisms exist in nature in the form of biofilms attached to a surface or located at an interface. Bacterial cells in a biofilm are much better protected from the effects of adverse environmental factors, including exposure to various chemical compounds. The widespread domestic and industrial use of surface-active substances (detergents) leads to their significant concentration in wastewater and, as a consequence, environmental pollution. It is

necessary to study such effects on microorganisms for a clearer understanding of anthropogenic effects on natural and anthropogenically modified microbiomes.

The article considers the influence of both individual surface-active substances (detergents) – sodium dodecyl sulfate, sodium lauroyl sarcosinate, and synthetic washing agents based on them in the concentration range from 0.001% to 0.5% on the process of biofilm formation by *Acinetobacter calcoaceticus* VKPM B-10353 strain. The crystal violet staining method was used to determine the intensity of biofilm formation. Fluorescein diacetate assay was used to assess the number of viable bacteria in the biofilm.

It has been shown that various detergents and washing agents have different effects on biofilm formation. The maximum inhibitory effect has been demonstrated for sodium dodecyl sulfate. At 0.05–0.5% concentrations of sodium dodecyl sulfate complete inhibition of biofilms development by *A. calcoaceticus* VKPM B-10353 strain was revealed. At concentrations of 0.005% and 0.01%, a stimulating effect was recorded, while no effect on the number of living cells was detected. Stimulation of biofilm formation was detected in the concentration range of 0.01–0.5% for shampoo based on sodium dodecyl sulfate. The maximum effect was recorded at the concentration of 0.05% – the intensity of biofilm formation was 785%, there was no significant effect on the number of living cells in the biofilm. A stimulating effect (243%) on biofilm formation was shown for sodium lauroyl sarcosinate at the concentration of 0.05%. At this concentration, as well as at the concentration of 0.5% an increase in the number of living cells was observed. The suppressing effect was recorded at the concentrations of 0.001%, 0.005% and 0.1% – the intensity of biofilm formation was 21.7–60.8%. The number of living cells when exposed to lauroyl sarcosinate decreased at the concentration of 0.1%. For children's soap based on sodium lauroyl sarcosinate inhibition of biofilm formation was recorded at all the studied concentrations, the intensity of biofilm formation varied in the range 13.8–82.3%, while the number of living cells also decreased. Thus, it was shown that depending on the concentration, detergents are able to both suppress and stimulate formation of bacterial biofilms. A stimulating effect on biofilm formation, which can lead to fouling of sewer pipes and sewage treatment plants, was recorded for low concentrations of detergents and synthetic detergents. It was determined that the change in biomass of a bacterial biofilm does not always correlate with the change in the number of living cells. It is important to note that antibacterial/antibiofilm activity of detergents should not be judged by the action of individual detergents included in their composition, since synergetic and interference interactions of all components of the agent can play a large role.

Keywords: sodium dodecyl sulfate, sodium lauroyl sarcosinate, synthetic detergent, intensity of biofilm formation, bacterial fouling.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) – химические соединения, которые, концентрируясь на поверхности раздела термодинамических фаз, уже при очень малых концентрациях (десятые доли процента) приводят к резкому изменению поверхностного натяжения. Молекулы ПАВ имеют в своём составе гидрофильный полярный компонент (функциональные группы -ОН, -СООН, -SOOHN, -O-, -NO₂, -NH₂) и неполярный гидрофобный элемент (гидрофобная углеводородная цепь, углеводородный радикал) [1]. Синтетические моющие средства (СМС) содержат в своей основе 20–40% ПАВ; добавки, повышающие моющую способность средства; а также ароматизаторы, консерванты, красители и др. [1]. Почти весь объём мировой продукции СМС попадает в сточные воды, что приводит к загрязнению поверхностных водоёмов, грунтовых вод и почв [2].

Широко изучено влияние ПАВ на микроорганизмы (МО). Так, например, ПАВ способны стимулировать рост численности МО, влиять на метаболические процессы в их клетках, подавляя дыхательную активность. Также ПАВ способны вызывать перестройки в липидных мембранах и разрушать клеточную стенку [3].

В настоящее время считают, что большая часть МО в окружающей среде существует

в форме биоплёнок (БП), а не в планктонной форме. Биоплёнка представляет собой сообщество МО, прикреплённых к поверхности или находящихся на границе раздела фаз и погружённых в экзополимерный матрикс [4]. Бактерии в составе БП лучше защищены от воздействия разных негативных факторов [5]. В различных концентрациях ПАВ способны как к подавлению развития БП [6], так и к увеличению её механической стабильности [7].

Целью данной работы являлось оценить влияние чистых ПАВ: додецилсульфата натрия («SERVA», Германия), лаурилсаркозината натрия («VWR Life Science AMRESCO», США); СМС: шампуня Чистотел «Мягкий» для щенков и котят (ЗАО «НПФ «Экопром», Россия); детского крем-мыла Ecolab «0 месяцев +» (ООО «ЭкоЛаборатория», Россия) на интенсивность образования БП штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* VKPM B-10353. Выбор СМС обусловлен ПАВ, входящими в их состав. Так, в состав шампуня Чистотел «Мягкий» для щенков и котят входит додецилсульфат натрия, а в состав детского крем-мыла Ecolab «0 месяцев +» – лаурилсаркозинат натрия. Додецилсульфат натрия и лаурилсаркозинат натрия являются широко используемыми анионными ПАВ, входящими в состав множества моющих и косметических средств [8].

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила моно-видовая БП штамма *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-10353.

Формирование БП осуществлялось в лунках полистиролового планшета («NUOVA ARTASA», Италия). Суспензию суточной культуры *A. calcoaceticus* ВКПМ В-10353 разводили средой LB [9] до титра $1 \cdot 10^8$ клеток/мл. В лунки планшета вносили 180 мкл полученной бактериальной суспензии и добавляли 20 мкл исследуемых веществ в различной концентрации. Часть лунок использовали в качестве положительного контроля, в них добавляли 20 мкл дистиллированной воды. В качестве отрицательного контроля использовали стерильный бульон. Планшет накрывали крышкой, заворачивали плёнкой Parafilm («Vemis Company», США) и инкубировали 24 ч при 30 °С. После инкубации для количественного определения интенсивности образования БП использовался метод окрашивания кристаллическим фиолетовым [10]. После удаления содержимого и промывки всех лунок, адгезированные бактерии фиксировали и окрашивали. Избыток красителя отмывали водопроводной водой. Краситель, связанный с адгезированными клетками, элюировали этанолом. Результаты учитывали спектрофотометрически с использованием планшетного ридера FLUOstar Omega («BMG LABTECH», Германия) при длине волны 570 нм. Количество сорбированного БП кристаллического фиолетового прямо пропорционально величине оптической плотности. Интенсивность образования БП рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{интенсивность образования БП (\%)} = \frac{T - B}{C - B} \cdot 100,$$

где С – значение оптической плотности положительного контроля, В – значение оптической плотности отрицательного контроля, Т – значение оптической плотности опыта [11]. Значения этого показателя ниже 100% свидетельствуют о подавляющем, а значения, превышающие 100% – о стимулирующем действии исследованных веществ на интенсивность образования БП.

Для определения количества жизнеспособных клеток использовался метод окрашивания флуоресцеин диацетатом (ФДА) [12]. Краситель («Sigma-Aldrich», США) растворяли в ацетоне в концентрации 10 мг/мл и ис-

ходный раствор хранили при -20 °С. Рабочий раствор 1:100 (ФДА/PBS) готовили перед каждым экспериментом. После удаления содержимого лунок с помощью многоканального дозатора и промывки лунок 250 мкл раствора натрий-фосфатного буфера (PBS («VWR Life Science AMRESCO», США)), в каждую лунку добавляли 200 мкл рабочего раствора ФДА. Планшеты инкубировали в темноте при 30 °С в течение 4 ч. После инкубации измеряли интенсивность флуоресценции ($\lambda_{ex} = 485$ нм и $\lambda_{em} = 520$ нм) с использованием планшетного ридера FLUOstar Omega («BMG LABTECH», Германия). Интенсивность флуоресценции (%) рассчитывали по аналогичной формуле, как и при определении интенсивности образования БП (%).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью стандартных методов математической статистики. Величины доверительных интервалов рассчитывали для $p \leq 0,05$. Для оценки статистической значимости различий использовали *t*-критерий Стьюдента [13]. Расчёты производили с помощью программы Microsoft Office Excel.

Результаты исследования

Данные, полученные при изучении влияния ПАВ и СМС на формирование БП штаммом *A. calcoaceticus* ВКПМ В-10353, представлены в таблице 1.

Додецилсульфат натрия оказал стимулирующее действие на интенсивность образования БП штаммом *A. calcoaceticus* ВКПМ В-10353 в концентрациях 0,005% и 0,01%. В диапазоне концентраций от 0,05% до 0,5% выявлено подавление образования БП и снижение количества живых клеток.

Вероятно, при воздействии низких концентраций додецилсульфата натрия (0,005% и 0,01%) увеличение биомассы БП является проявлением защитных функций. Так как количество живых клеток при этом остаётся на уровне положительного контроля, можно предположить, что увеличение общей биомассы связано с увеличением биомассы экзополимерного матрикса БП. Отсутствие же формирования БП в концентрациях от 0,05% до 0,5%, вероятно, связано с высокой противомикробной активностью додецилсульфата натрия. Согласно литературным данным, минимальная ингибирующая концентрация додецилсульфата натрия для штаммов *Escherichia coli* NCTC 10418, *Bacillus subtilis* NCTC

Таблица 1 / Table 1

Влияние исследованных поверхностно-активных веществ и синтетических моющих средств на формирование биоплёнки штаммом *A. calcoaceticus* ВКПМ В-10353
Influence of the investigated surface-active substances and synthetic detergents on biofilm formation by the *Acinetobacter calcoaceticus* VKPM В-10353 strain

Вещество Compound	Концентрация Concentration	Интенсивность образования биоплёнки (%) Intensity of biofilm formation (%)	Интенсивность флуоресценции (%) Fluorescence intensity (%)
Додецилсульфат натрия Sodium dodecyl sulfate	0,001%	105,33	135,91
	0,005%	387,57*	69,71
	0,01%	347,34*	117,86
	0,05%	0,00*	0,00*
	0,1%	0,00*	10,81*
	0,5%	0,00*	5,00*
Шампунь Чистотел «Мягкий» Shampoo Chistotel “Myagkiy”	0,001%	134,83	56,66*
	0,005%	139,33	54,07
	0,01%	311,24*	50,54
	0,05%	785,39*	60,75
	0,1%	268,54*	99,85
	0,5%	316,85*	101,10
Лаурилсаркозинат натрия Sodium lauroyl sarcosinate	0,001%	60,84*	95,74
	0,005%	52,80*	105,28
	0,01%	79,37	103,48
	0,05%	243,01*	177,37*
	0,1%	21,68*	0,00*
	0,5%	120,63	207,28*
Крем-мыло Ecolab Cream-soap Ecolab	0,001%	81,90*	60,44*
	0,005%	82,33*	52,25*
	0,01%	81,47*	34,93*
	0,05%	67,24*	0,00*
	0,1%	21,12*	8,60*
	0,5%	13,79*	23,85*

Примечание: * – различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Note: * – the differences are significant at $p \leq 0.05$.

10400 и *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 составляла 0,2%, для штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 – 1% [14]. Известна также антибиоплёночная активность додецилсульфата натрия по отношению к БП штамма *Staphylococcus aureus* [15].

Шампунь Чистотел «Мягкий» для щенков и котят – синтетическое моющее средство на основе додецилсульфата натрия. Данное СМС стимулировало образование БП штаммом *A. calcoaceticus* ВКПМ В-10353 в диапазоне концентраций 0,01–0,5%. При этом лишь в концентрации 0,001% отмечено статистически значимое снижение численности живых клеток – интенсивность флуоресценции ниже значений положительного контроля на 43,34%. Можно предположить, что, как и в случае с чистым додецилсульфатом натрия,

увеличение биомассы БП происходит также за счёт увеличения синтеза компонентов экзополимерного матрикса. Помимо этого, такой колоссальный прирост биомассы может быть обусловлен тем, что в составе БП находится большое число мёртвых бактериальных клеток. Мёртвые клетки играют важную роль в формировании структурной организации БП и механизмов защиты [16].

Такой эффект может достигаться за счёт синергетического действия всех компонентов, входящих в состав данного СМС. Так, помимо додецилсульфата натрия, в состав шампуня входят динатрий кокоамфоацетат, диэтаноламид кокосового масла, экстракт ромашки, обладающий антимикробным потенциалом [17] и лимонная кислота, способная проявлять антибактериальную активность [18].

Уменьшение количества живых клеток в минимальной из исследованных концентраций (0,001%) можно сравнить с действием некоторых антибиотиков, способных подавлять формирование БП при низких концентрациях, стимулировать при повышении концентрации и снова подавлять при дальнейшем увеличении концентрации [19].

Лаурилсаркозинат натрия оказал стимулирующее действие на формирование БП в концентрации 0,05% (интенсивность образования БП составила 243,01%). В этой концентрации, а также в концентрации 0,5% наблюдалось увеличение количества живых клеток и интенсивности флуоресценции на 77,37% и 107,28% выше значений положительного контроля, соответственно.

Ингибирующий эффект показан в концентрациях 0,001%; 0,005% и 0,1%. Максимальное ингибирующее воздействие зарегистрировано в концентрации 0,1%, при которой интенсивность образования БП составила 21,68%. Количество живых клеток также снижалось при воздействии лаурилсаркозината в концентрации 0,1% – интенсивность флуоресценции не имеет статистически значимых различий со значениями отрицательного контроля. В литературе сообщается об антимикробной активности саркозинатов против *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* [20].

Детское крем-мыло Ecolab «0 месяцев +» – синтетическое моющее средство на основе лаурилсаркозината натрия. Данное СМС оказало подавляющее действие на интенсивность образования БП во всех исследованных концентрациях, причём максимальный ингибирующий эффект показан в концентрации 0,5% – интенсивность образования БП составила 13,79%. Данное крем-мыло также снизило количество живых клеток в БП во всех исследованных концентрациях.

Разница в действии лаурилсаркозината натрия и СМС на его основе, вероятно, обусловлена присутствием в крем-мыле дополнительных компонентов. В состав данного средства входит кокамидопропилбетаин, масло сладкого миндаля, экстракт цветков календулы, экстракт мальвы, обладающие антибактериальной активностью [21]. Все эти вещества в совокупности могут обуславливать бактерицидный эффект детского крем-мыла.

Заключение

Таким образом, исследованные ПАВ и СМС показали различное действие на развитие БП,

которое, в том числе, зависело и от вносимых концентраций данных веществ. Практически все из исследованных ПАВ и СМС (кроме шампуня Чистотел «Мягкий») способны подавлять развитие БП минимум в одной из исследованных концентраций, что является преимуществом при применении их по назначению. Однако более низкие исследованные концентрации обладают стимулирующим эффектом (кроме детского крем-мыла Ecolab «0 месяцев +»), что может приводить к биообрастанию канализационных труб и очистных сооружений.

Додецилсульфат натрия является эффективным антибиоплёночным агентом – в концентрациях 0,05–0,5% он полностью подавляет развитие БП штаммом *A. calcoaceticus* ВКПМ В-10353.

Однако не следует судить об антибактериальной/антибиоплёночной активности по действию лишь одного ПАВ, входящего в состав СМС, так как большую роль могут играть синергетические и интерференционные взаимодействия всех компонентов средства.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № 0852-2020-0029 и гранта Президента РФ (грант № НШ-2511.2020.11).

Funding: Research was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of State assignment No. 0852-2020-0029 in the field of scientific activity, and President of Russian Federation (grant No. NSh-2511.2020.11).

References

1. Lange K.R. Surfactants: a practical Handbook. Munich: Hanser Publishers, 1999. 237 p.
2. Kogawa A.C., Cernic B.G., do Couto L.G.D., Salgado H.R.N. Synthetic detergents: 100 years of history // Saudi Pharmaceutical Journal. 2017. V. 25. No. 6. P. 934–938. doi: 10.1016/j.jsps.2017.02.006
3. Domracheva L.I., Simakova V.S. Reactions of prokaryotic microorganisms to the action of synthetic surfactants (review) // Theoretical and Applied Ecology. 2018. No. 1. P. 5–17 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2018-1-005-017
4. Flemming H.C., Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms // Nature Reviews Microbiology. 2019. V. 17. No. 4. P. 247–260. doi: 10.1038/s41579-019-0158-9
5. Yin W., Yin W., Wang Y., Liu L., He J. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments //

- International Journal of Molecular Sciences. 2019. V. 20. No. 14. P. 3423. doi: 10.3390/ijms20143423
6. Nillian E., Melinda S., Vincent M., Bilung L. Efficiency of detergents against microbial biofilm growth in Kuching, Sarawak // *Clinical Microbiology: Open Access*. 2016. V. 5. P. 1–4. doi: 10.4172/2327-5073.1000263
7. Simoes M., Simoes L.C., Pereira M.O., Vieira M.J. Sodium dodecyl sulfate allows the persistence and recovery of biofilms of *Pseudomonas fluorescens* formed under different hydrodynamic conditions // *Biofouling*. 2008. V. 24. No. 1. P. 35–44. doi: 10.1080/08927010701730311
8. Surfactants in Cosmetics / Eds. M.M. Rieger, L.D. Rhein. NY: Marcel Dekker Inc, 2017. 658 p.
9. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 479 p.
10. Gildebrant A.V., Kushnareva D.N., Kaplina A.V., Mozgovaya A.I., Sazykin I.S., Sazykina M.A. The Effect of Pollutants on the Intensity of Biofilm Formation by the Strain *Vibrio aquamarinus* VKPM B-11245 // *Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2019. V. 19. No. 1. P. 103–111 (in Russian). doi: 10.18500/1816-9775-2019-19-1-103-111
11. Salari S., Seddighi N.S., Almani P.G.N. Evaluation of biofilm formation ability in different *Candida* strains and anti-biofilm effects of Fe₃O₄-NPs compared with Fluconazole: an in vitro study // *Journal de Mycologie Medicale*. 2018. V. 28. No. 1. P. 23–28. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.02.007
12. Peeters E., Nelis H.J., Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates // *Journal of Microbiological Methods*. 2008. V. 72. No. 2. P. 157–165. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.010
13. Lakin G.F. Biometry. Moskva: Vysshaya Shkola, 1990. 351 p. (in Russian).
14. Díaz De Rienzo M.A., Stevenson P., Marchant R., Banat I.M. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and-negative bacteria // *FEMS Microbiology Letters*. 2016. V. 363. No. 2. P. fnv224. doi: 10.1093/femsle/fnv224
15. Shen Y., Li P., Chen X., Zou Y., Li H., Yuan G., Hu H. Activity of sodium lauryl sulfate, rhamnolipids, and N-acetylcysteine against biofilms of five common pathogens // *Microbial Drug Resistance*. 2020. V. 26. No. 3. P. 290–299. doi: 10.1089/mdr.2018.0385
16. Asally M., Kittisopikul M., Rué P., Du Y., Hu Z., Çağatay T., Robinson A.B., Lu H., Garcia-Ojalvo J., Süel G.M. Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. V. 109. No. 46. P. 18891–18896. doi: 10.1073/pnas.1212429109
17. Abdalla R.M., Abdelgadir A.E. Antibacterial activity and phytochemical constituents of *Cinnamomum verum* and *Matricaria chamomilla* from Sudan // *Bio Bulletin*. 2016. V. 2. No. 2. P. 8–12.
18. In Y.W., Kim J.J., Kim H.J., Oh S.W. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *Shigella* species // *Journal of Food Safety*. 2013. V. 33. No. 1. P. 79–85. doi: 10.1111/jfs.12025
19. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation // *The International Journal of Artificial Organs*. 2011. V. 34. No. 9. P. 737–751. doi: 10.5301/ijao.5000027.
20. Yapar S., Ateş M., Özdemir G. Preparation and characterization of sodium lauroyl sarcosinate adsorbed on cetylpyridinium-montmorillonite as a possible antibacterial agent // *Applied Clay Science*. 2017. V. 150. P. 16–22. doi: 10.1016/j.clay.2017.08.025
21. Alizadeh F., Khodavandi A., Faraji F.S. *Malva sylvestris* inhibits *Candida albicans* biofilm formation // *Journal of Herbmед Pharmacology*. 2017. V. 6. No. 2. P. 62–68.