

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО ”

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

"На правах рукопису"

УДК 577.18.01

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Т.С.Тодосійчук
(підпис) (ініціали, прізвище)

“09” квітня 2021 р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія

на тему: Аналіз властивостей антибіотика батуміну та його похідних, що синтезуються *Pseudomonas batumici*

Виконала: студентка 2 курсу, групи БТ-91мн

Ліпова Інна Ігорівна

Науковий керівник: доцент кафедри промислової

біотехнології, к.б.н., с.н.с. Ключко В.В.

Консультант з старт-апу

к.е.н., доцент кафедри економіки і підприємництва

Ткаченко Тетяна Петрівна

Рецензент: заст. дир. з н. р. Інституту мікробіології і вірусології

ім. Д.К. Заболотного НАН України, к.б.н., с.н.с. Войчук С. І.

(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

(підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації
немає запозичень з праць інших авторів без
відповідних посилань.

Студентка _____
(підпис)

Київ – 2021

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти - другий (магістерський)

Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Освітньо-наукова програма Біотехнології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри промислової
біотехнології

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК
(підпис)

“17” лютого 2021 р.

ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студентці

Ліповій Інні Ігорівні

1. Тема дисертації Аналіз властивостей антибіотика батуміну та його похідних, що синтезуються *Pseudomonas batumici*

науковий керівник дисертації Клочко Віталій Вікторович, к.б.н., с.н.с.

затверджені наказом по університету від “12” квітня 2021 р. № 993-с

2. Термін подання студентом дисертації “_____” _____ 2021 р.

3. Об’єкт дослідження штам *Pseudomonas batumici* УКМ В-321

4. Предмет дослідження фізико-хімічні та антибіотичні властивості батуміну та його похідних штаму *Pseudomonas batumici* УКМ В-321

5. Перелік завдань, які потрібно зробити:

За даними, що наявні у літературі провести огляд роду *Pseudomonas* як продуцентів антибіотично активних речовин, огляд стафілококових інфекцій та сучасного стану методів боротьби із ними, огляд полікетидних антибіотиків, що синтезуються мікроорганізмами

Визначити антагоністичні властивості штаму *P.batumici* УКМ В-321 щодо умовно-патогенних тест-штамів, провести культивування досліджуваного штаму, екстракцію батуміну та його похідних із культуральної рідини

Методом тонкошарової хроматографії розділити екстраговані речовини та провести їх біоавтографію

Визначити фізико-хімічні властивості екстрагованих антибіотичних речовин методами спектрофотометрії, вискоефективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії

Визначити антибіотичну активність виділених сполук на клінічних штаммах стафілококів

Розробити стартап-проект

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу Антагонізм досліджуваного штаму, біоавтографія, результати тонкошарової хроматографії, спектрограма антибіотичних сполук, результати високоефективної рідинної хроматографії, мікроскопіювання виділених клінічних штамів, динаміка сукупного прибутку при розробці антибіотика у вигляді графіку

7. Орієнтовний перелік публікацій 4 тез на конференціях, 1 стаття у виданні, що індексується в Scopus - «Мікробіологічний журнал»

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видала	завдання прийняла
Старт-ап	Ткаченко Т.П. к.е.н., доц. каф. економіки і підприємництва		

9. Дата видачі завдання “17” лютого 2021 р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1.	Огляд літератури	09.09.19-23.12.19	
2.	Підбір та опрацювання методів досліджень	12.01.20-12.03.20	
3.	Виконання експериментальних досліджень	12.01.20-12.03.20, 01.02.21-07.03.21	З перервами на локдаун
4.	Аналіз отриманих даних, статистична обробка	01.03.21-07.03.21	
5.	Розробка стартап-проекту	01.03.21-31.03.21	
6.	Оформлення магістерської дисертації	01.04.21-07.04.21	
7.	Подання дисертації до ЕК	17.04.2021р.	

Студентка

Інна ЛІПОВА

Керівник

Віталій КЛОЧКО

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація: 91 с., 29 табл., 18 рис., 61 джерело

За останні 30 років було введено дуже мало антибіотиків, що представляють нові хімічні класи. Дослідження антибіотиків з новими механізмами дії для боротьби зі стафілококовими інфекціями необхідні для створення нових лікарських засобів, які замінять існуючі менш ефективні засоби.

Наукова робота за темою «Аналіз властивостей антибіотика батуміну та його похідних, що синтезуються *Pseudomonas batumici*» (номер теми – 0115U004129) виконувалась на базі відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Метою роботи була ідентифікація антибіотично активних сполук штаму *P. batumici* УКМ В-321 та визначення їх фізико-хімічних і біологічних властивостей.

Завданнями дослідження було:

1. Визначення антагоністичної активності штаму *P. batumici* УКМ В-321 щодо мікроорганізмів різних таксономічних груп.
2. Отримання екстрактів антибіотично активних сполук з культуральної рідини штаму *P. batumici* УКМ В-321.
3. Визначення антибіотичної активності екстрагованих речовин щодо широкого спектру тест-мікроорганізмів.
4. Встановлення фізико-хімічних властивостей отриманих сполук: визначення спектрів поглинання, фактору розділення, молекулярної маси.

Об'єкт дослідження – штам *Pseudomonas batumici* УКМ В-321. Предмет дослідження – фізико-хімічні та антибіотичні властивості батуміну та його похідних штаму *Pseudomonas batumici* УКМ В-321.

В роботі використовували мікробіологічні, біотехнологічні, біохімічні та фізико-хімічні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів: виділено 5 антибіотичних сполук спорідненої природи, визначена їх біологічна дія на умовно-патогенні мікроорганізми; виділені антибіотичні сполуки охарактеризовано за їх фізико-хімічними властивостями (R_f : 0.42, 0.38, 0.31, 0.28, 0.25; $\lambda_{\max}$ = 226, 228, 231, 231, 229 нм; молекулярні маси: 505, 505, 548, 548, 550 для сполук 1-5 відповідно); проведено порівняння антибіотичних властивостей кожної з сполук та запропоновано їх структурні формули.

В рамках одного з завдань магістерської дисертації було розроблено стартап проект «Розробка і продаж технології виробництва антибіотика батуміну у вигляді АФІ».

PSEUDOMONAS, АНТИБІОТИК БАТУМІН, ТАУТОМЕРІЯ,
СТАФІЛОКОКОВІ ІНФЕКЦІЇ, ПОЛІКЕТИДНІ АНТИБІОТИКИ

ABSTRACT

Master's dissertation: 91 pp., 29 tables, 18 figures, 61 sources

Very few antibiotics representing new chemical classes have been introduced in the last 30 years. Studies of antibiotics with new mechanisms of action to combat staphylococcal infections are needed to create new drugs that will replace existing less effective drugs.

Scientific work on the topic "Analysis of the properties of the antibiotic batumin and its derivatives synthesized by *Pseudomonas batumici*" (topic number – 0115U004129) was performed on the basis of the department of antibiotics of the Institute of Microbiology and Virology. D.K. Zabolotny NAS of Ukraine.

The aim of the study was to identify antibiotic compounds of the strain *P. batumici* B-321 and determine their physicochemical and biological properties.

The objectives of the study were:

1. Determination of the antagonistic activity of the strain *P. batumici* UCM B-321 against microorganisms of different taxonomic groups.

2. Obtaining extracts of antibiotic compounds from the culture fluid of the strain *P. batumici* UCM B-321.

3. Determination of antibiotic activity of extracted substances against a wide range of test microorganisms.

4. Establishment of physicochemical properties of the obtained compounds: determination of absorption spectra, separation factor, molecular weight.

The object of study is the strain *Pseudomonas batumici* UCM B-321. The subject of research – physicochemical and antibiotic properties of batumin and its derivatives from the strain *Pseudomonas batumici* UCM B-321.

Microbiological, biotechnological, biochemical and physicochemical research methods were used in the work.

Scientific novelty of the obtained results: 5 antibiotic compounds of related nature were isolated, their biological effect on opportunistic pathogens was determined; isolated antibiotic compounds are characterized by their physicochemical properties (R_f : 0.42, 0.38, 0.31, 0.28, 0.25; $\lambda_{\max}$ = 226, 228, 231, 231, 229 nm; molecular weight: 505, 505, 548, 548, 550 for compounds 1-5, respectively); the antibiotic properties of each of the compounds are compared and their structural formulas are proposed.

As part of one of the tasks of the master's dissertation, a startup project "Development and sale of technology for the production of antibiotic batumin in the form of API" was developed.

PSEUDOMONAS, BATUMIN ANTIBIOTIC, TAUTOMERIA,
STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS, POLYKETIDE ANTIBIOTICS

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	12
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Бактерії роду <i>Pseudomonas</i> – продуценти антибіотично активних речовин.....	12
1.2. Стафілококові інфекції.....	18
1.3. Полікетидні антибіотики та їх похідні.....	20
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	24
2.1. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	24
2.1.1. Умови підтримання і зберігання штаму-продуценту.....	24
2.1.2. Визначення антагоністичних властивостей.....	24
2.1.3. Культивування штаму <i>P. batumici</i> УКМ В-321 та визначення його антибіотичних властивостей.....	25
2.1.4. Виділення антибіотичних сполук.....	25
2.1.5. Біоавтографія виділених сполук.....	25
2.1.6. Спектрометрія, рідинна хроматографія та масс-спектрометрія.....	26
2.1.7. Виділення клінічних ізолятів <i>Staphylococcus</i>	26
2.1.8. Родова ідентифікація виділених клінічних штамів.....	26
2.1.9. Обробка отриманих даних.....	28
2.2. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	29
2.2.1. Антагоністичні властивості штаму <i>P. batumici</i> УКМ В-321.....	29
2.2.2. Визначення антибіотичної активності культуральної рідини штаму <i>P. batumici</i> УКМ В-321.....	30
2.2.3. Виділення та аналіз сполук <i>P. batumici</i> УКМ В-321 антибіотичної природи.....	31

2.2.4. Біоавтографія виділених сполук.....	33
2.2.5. Спектрометрія, рідинна хроматографія та мас-спектрометрія виділених сполук.....	38
2.2.6. Ідентифікація виділених клінічних штамів.....	44
3. РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЕКТУ.....	50
3.1. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу.....	52
3.2. Визначення ключових факторів успіху проекту.....	60
3.3. Визначення потенційних споживачів.....	62
3.4. Ціна інноваційної пропозиції на ринку.....	65
3.5. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту.....	72
3.6. Ризики стартап-проекту та методи управління ними.....	74
ВИСНОВКИ.....	78
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	79
Додаток А.....	87
Додаток Б.....	89
Додаток В.....	90

ВСТУП

Пройшло майже сто років з моменту відкриття антибіотиків Александером Флемінгом, а пошук, дослідження і виробництво нових антибіотичних препаратів надалі є необхідним для медицини, адже на даний час альтернативних дієвих засобів для боротьби із більшістю інфекційних хвороб немає.

Актуальність теми

Поширення резистентності збудників інфекційних хвороб разом із майже відсутністю альтернативних шляхів боротьби робить пошук, розробку і впровадження виробництва нових антибіотичних речовин нагальною потребою людства. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) закликає активізувати пошук нових антимікробних агентів. За даними ВООЗ, стафілокок очолює список бактерій, якими найчастіше заражаються в медичних установах розвинених країн, разом з тим швидко зростає і антибіотикорезистентність цього патогену. Пандемія COVID-19 лише загострила цю проблему, через те, що велика кількість людей стала вразливою до вторинних інфекцій, в тому числі і до внутрішньолікарняних спалахів золотистого стафілококу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Наукова робота з дослідження антибіотичних сполук штаму *Pseudomonas batumici* УКМ В-321 виконувалась на базі відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Основним напрямком роботи відділу є дослідження продуцентів біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків, пігментів та ферментів. Тематика відділу поєднує фундаментальні еколого-таксономічні дослідження бактерій родів *Pseudomonas* і *Bacillus* та засоби їх практичного застосування.

Мета й завдання дослідження

Метою роботи була ідентифікація антибіотично активних сполук штаму *P. batumici* УКМ В-321 та визначення їх фізико-хімічних і біологічних властивостей.

Завдання дослідження:

1. За даними, що наявні у літературі провести огляд роду *Pseudomonas* як

продуцентів антибіотично активних речовин, огляд стафілококових інфекцій та сучасного стану методів боротьби із ними, огляд полікетидних антибіотиків, що синтезуються мікроорганізмами.

2. Визначити антагоністичні властивості штаму *P.batumici* УКМ В-321 щодо умовно-патогенних тест-штамів, провести культивування досліджуваного штаму, екстракцію батуміну та його похідних із культуральної рідини.
3. Методом тонкошарової хроматографії розділити екстраговані речовини та провести їх біоавтографію.
4. Визначити фізико-хімічні властивості екстрагованих антибіотичних речовин методами спектрофотометрії, високоефективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії.
5. Визначити антибіотичну активність виділених сполук на клінічних штаммах стафілококів.

Об'єкт дослідження

Об'єкт дослідження – штам *Pseudomonas batumici* УКМ В-321.

Предмет дослідження

Предмет дослідження – фізико-хімічні та антибіотичні властивості батуміну та його похідних штаму *Pseudomonas batumici* УКМ В-321.

Методи дослідження

В роботі використовували мікробіологічні, біотехнологічні, біохімічні та фізико-хімічні методи дослідження. Антагоністичну активність визначали на чашках Петрі методом відстроченого антагонізму, використовуючи радіальні штрихи тест-штамів.

Виділення антибіотика батуміну і його похідних з культуральної рідини проводили методом екстракції хлороформом. Розділення сполук, споріднених до батуміну проводили в бензол-ізопропаноловій системі методом тонкошарової хроматографії.

Для отримання фізико-хімічних характеристик антибіотиків використовували методи спектрометрії та рідинної хроматографії з мас-спектрометрією. Біологічну активність сполук визначали методом біоавтографії з використанням умовно-

патогенних референс-штамів.

Експериментальні результати обробляли статистично методом дисперсійного аналізу з використанням пакетів спеціальних програм Microsoft Excel та Statistica v.10 (StatSoft, Inc., 2011).

Наукова новизна одержаних результатів

З культуральної рідини штаму *P. batumici* УКМ В-321 вперше виділено ряд сполук, що є похідними антибіотика батуміну.

Проведено ідентифікацію отриманих сполук за фізико-хімічними та біологічними властивостями, визначено їх молекулярну масу, запропоновано хімічну структуру молекул.

Встановлено спектр антибіотичної дії похідних сполук батуміну щодо умовно-патогенних мікроорганізмів.

Отримано нові фундаментальні дані, які доповнюють попередні дослідження процесів біосинтезу продуценту батуміну *P. batumici* УКМ В-321.

Практичне значення одержаних результатів

Розроблено стартап «Розробка і продаж технології виробництва антибіотика батуміну у вигляді АФІ».

Апробація результатів дисертації

Результати досліджень, що включені до дисертації, були оприлюднені на XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції “Біотехнологія XXI століття”, на VIII Науково-практичній конференції Школи молодих науковців АТ «Фармак», на II конференції молодих вчених Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного “Молодь та сучасні проблеми мікробіології і вірусології”.

Публікації

1. Antistafilococcal activity of the cultural liquid of *Pseudomonas batumici* UCM В-321 strain / Lipova I. // Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» 20 травня 2020 року, с. 58

2. Antibiotic batumin: extraction, purification and analysis / Lipova I. I., Klochko V.V. // Матеріали VIII Науково-практичної конференції Школи молодих науковців АТ «Фармак», Київ 2020, с. 23
3. Antibiotic batumin and related compounds biosynthesis / Lipova I., Klochko V. // Conference materials of the II young scientists conference «Youth and modern problems of microbiology and virology» (23-26 November 2020, Kyiv, Ukraine), с. 22
4. Prevention of *Staphylococcus aureus* infection in dialysis patients with mupirocin: a meta-analysis / Lipova I. // Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» 23 квітня 2021 року, с. 65
5. Ecological aspect of antibiotic batumin synthesis by *Pseudomonas batumici* / V.V. Klochko, I.I. Lipova, N.V. Chuiko, L.V. Avdeeva // Мікробіологічний журнал, 2021, Т. 83, № 3 [прийнято до друку]

Публікації, не за темою дисертації:

1. Bioconversion of cellulosic biomass using systems of micro-organisms / Lipova I. // збірник XX Міжнародної студентської науково-практичної конференції „Science and technology of the XXI century“, 28 листопада 2019 р., с. 49-50
2. Почуття міри у педагогічних відносинах в еру нової етики / Ліпова І.І. // Етико-естетична традиція у вітчизняній культурі: Тези X Всеукраїнської студентської науково-практичної конференції, 26 листопада 2020 року. – К.: Кафедра етики та естетики НПУ імені М.П. Драгоманова, 2020, с. 45-48

ОСНОВНА ЧАСТИНА

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Бактерії роду *Pseudomonas* – продуценти антибіотично активних речовин

Бактерії роду *Pseudomonas* являють собою групу грамнегативних бактерій, що здатні синтезувати різноманітні вторинні метаболіти та біополімери, що мають біотехнологічне значення [1].

Представники роду *Pseudomonas* синтезують близько 800 біоактивних речовин, до яких належать 600 антибіотиків, а решта мають інші біоактивні властивості, крім антибіотичної [2]. Окремі, найбільш вивчені види роду являють собою справжні «фабрики антибіотиків». Так, з *P. aeruginosa* виділено понад 30, з *P. fluorescens* – більше 20 різних антибіотичних речовин [3].

Антибактеріальні метаболіти *Pseudomonas* проявляють різноманітні механізми дії, оскільки вони впливають на клітинну мембрану, що призводить до лізису клітин або інгібує ферменти, такі як ацетил-коА карбоксилаза та синтез оксиду азоту [2].

Широко поширеною для бактерій роду *Pseudomonas* є здатність до синтезу ациклічних антибіотиків. До їх числа відноситься, перш за все, антифунгін, активний по відношенню до грампозитивних і грамнегативних бактерій в концентрації 10 мкг/мл.

З культуральної рідини *P. aeruginosa* була виділена рамноліпідпіоліпова кислота, що складається з одного залишку рамнози та двох залишків 1- β -оксидеканової кислоти і активна проти *Mycobacterium tuberculosis* в концентрації 30 мкг/мл.

Pseudomonas cocovenenans утворює кілька антибіотичних речовин, дві з них високотоксичні, в тому числі токсофлавін – гетероциклічний антибіотик, ненасичена розгалужена бонгкрекова кислота загальної формули $C_{28}H_{38}O_7$. В

основі токсичної дії бонгкрекової кислоти на тваринні клітини лежить пригнічення обміну аденінових нуклеотидів в мітохондріях. Антибіотик має значну фунгіцидну активність, пригнічує зростання багатьох мікроскопічних грибів і проростання їх спор.

До ациклічних азотовмісних антибіотичних сполук відноситься фрагін – антибіотик, виділений з *P. fragi*. Фрагін характеризується антимікробними, протипухлинними і антивірусними властивостями. Антибіотик діє на *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae* в концентрації 100 мкг / мл, пригнічує *in vitro* клітини саркоми Іошіда і розмноження деяких вірусів.

Антибіотики ацетиленового ряду сепацині А і В виділено з штаму *P. ceracia* ATCC 39356. Ці активні відносно грампозитивних і грамнегативних бактерій антибіотичні речовини близькі за будовою немотину – ацетиленового антибіотика, що синтезується деякими базидіоміцетами.

Низькомолекулярні, що містять азот і сірку, антибіотики – флюоопсини були виділені з *P. fluorescens*. Флюоопсини проявляють високу активність відносно багатьох грампозитивних і грамнегативних бактерій, діють *in vitro* на клітини HeLa, саркоми і аденокарциноми Ерліха.

Найпростішим антибіотиком ароматичної структури, утворюваним бактеріями *Pseudomonas*, є саліцилова кислота, яка широко застосовується в медичній практиці і харчовій промисловості антисептичний засіб. Псевдомонади синтезують саліцилову кислоту з нафталіну, серед активних продуцентів описані штами *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*.

З клітин штаму *Pseudomonas species* BMG 13-A 7 виділили антибіотик ароматичної будови бактоболін, що діє на грампозитивні і грамнегативні бактерії і пухлини.

Встановлено будову чотирьох біологічно активних метаболітів штамів *P. aurantiaca*, що відносяться до похідних флороглюцину і обумовлюють високу антагоністичну активність цього виду.

Особливу групу антибіотиків ароматичної будови, утворених бактеріями роду *Pseudomonas*, складають трополони. Антибіотик близький сполуці, що синтезується штамми фітопатогенів виду *P. plantarii*. Цікаво, що саме цей трополон викликає у рослин рису симптоми захворювання. Сполука активна відносно грампозитивних і грамнегативних бактерій.

Пігменти, що синтезуються бактеріями роду *Pseudomonas* також проявляють антибіотичну активність. Серед них: піоціанін, гемопіоціанін, оксихлорографін, аеругінозини А і В, феназини.

Серед інших антибіотиків гетероциклічної природи представлені похідні хіноліну, аміноглікозиди і монобактами, похідні піролу, поліпептиди, β -лактамі антибіотики [3].

Pseudomonas bromoutilis продукує антибіотик піролу-2,3,4-трибром-5 (1-гідрокси, 1',4'-дибромфеніл) пірол, інгібітор грампозитивних бактерій, таких як золотистий стафілокок, *Streptococcus pneumoniae* та *S. pyogenes* при 0,0063 мкг / мл та *Mycobacterium tuberculosis* при 0,2 мкг/мл.

Pseudomonas sp. AMSN синтезує 2,4-діацетилфлороглюцинол (ДАФГ), високоактивний антибіотик проти метицилінорезистентного *S. aureus* (MRSA) з діапазоном МІК 0,25–1,0 мкг/мл . Повідомлялося, що ДАФГ діє проти резистентних до ванкоміцину штамів *S. aureus* (VRSA) та *Enterococcus spp.* (VRE) генотип А і В.

Pseudomonas stutzeri CMG1030 продукує дві нові речовини, зафрін [4b-метил-5, 6, 7, 8 тетрагідро-1 (4b-Н) -фенантренон] та бушрин (7- (3-фурил) -3,7-диметил-7 , 8-дигідро-1-нафталенол) з антимікробною активністю. Зафрін активний проти *Salmonella typhi* та *S. aureus*, але не проти *Candida albicans*. На відміну від цього, бушрин є більш універсальним і активний проти ряду грампозитивних та грамнегативних бактерій, а саме. *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *S. aureus* (MSSA та MRSA), *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *V. harveyi*, *S. typhi*, *P. mirabilis*, *P. morgani*, *Shewanella putrefaciens*, *Hafnia alvei* та *Serratia marcescens*, однак неактивні

щодо *C. albicans*, *Klebsiella aerogenes* та *Streptococcus* групи G. Антибактеріальна активність цієї речовини призводить до лізису клітин [2].

Зі штаму *P. fluorescens* NCIB 10586 було отримано активний антибіотик загальної формули $C_{26}H_{44}O_9$, названий псевдомоновою кислотою. За хімічною будовою псевдомонова кислота не має подібності з іншими антибіотичними речовинами, що застосовуються в клініці. Її основний антибіотично активний компонент – псевдомонова кислота А - складається з 9-оксинонанової кислоти, гідроксил якої приєднаний до іншої частини молекули – C_{17} -фрагменту (монової кислоти) через α , β -ненасичений ефірний зв'язок (рис. 1.1).

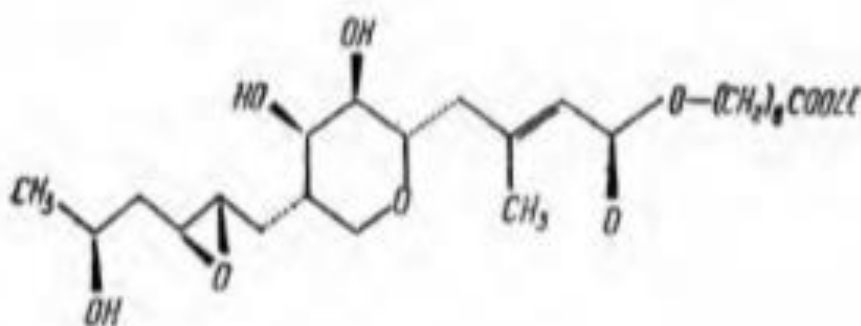


Рис. 1.1. Мупіроцин – літїєва сіль псевдомонової кислоти

Отримання препарату для медичної практики здійснюється глибинним вирощуванням *P. fluorescens*. За допомогою мутагенезу селекціоновані активні штами *P. fluorescens* і вивчені шляхи біосинтезу оригінальної, раніше не виділеної з природи жирнокислотної частини антибіотика. Згодом псевдомоновою кислотою отримала назву мупіроцину. Під цією назвою антибіотик включений в Британську фармакопею і прийнятий Всесвітньою організацією охорони здоров'я.

Маючи структурні угруповання, подібні до ізолейцину, мупіроцин оборотно зв'язується з ізолейцил-тРНК-синтетазою, перешкоджаючи включенню ізолейцину в білок і блокуючи таким чином білковий синтез. Спектр антимікробної активності мупіроцину *in vitro* включає перш за все стафілококи і стрептококи, в тому числі штами, стійкі до широкого спектру антибіотиків. Їх ріст, як правило, пригнічується мупіроцином в концентрації 0,015-0,03 мкг/мл, рідкісних штамів – в дозі 2 мкг/мл.

Активність мупіроцину зростає зі зниженням рН, що доречно для його місцевого застосування, оскільки рН шкіри – 5,5 [3].

Pseudomonas batumici синтезує полікетидний антибіотик батумін (рис.1.2), який має високу селективну активність щодо стафілококів, мінімальна інгібуюча концентрація антибіотику становить 0,25-0,5 мкг/мл. Антистафілококова активність батуміну *in vitro* в 8-32 разів вища, ніж в аналогічних антибіотиків. Концентрація батуміну в середовищі 0,125 мкг/мл (половина концентрації, що гальмує ріст) значно знижує утворення біоплівки у 85% досліджуваних носових штамів стафілококів. Максимальна активність антибіотика проявляється при рН 5,5, аналогічно мупіроцину. При цьому він не проявляє антибіотичної активності по відношенню до мікроорганізмів інших родів, таких як *Bacillus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Brevundimonas* і значно слабшу проти *Klebsiella* і *Bordetella* (МІК – 8 мкг/мл) [4, 5].

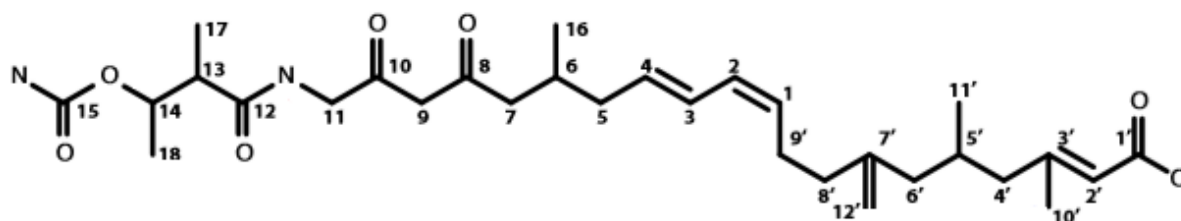


Рис. 1.2. Будова батуміну [6]

Батумін переважно інгібує синтез жирних кислот, незважаючи на прогнозовану сильну спорідненість до ізолейцил- та лейцил-тРНК-синтетаз, що беруть участь у синтезі білка.

Методом молекулярного докінгу було передбачено можливу протипухлинну дію батуміну та вище згадуваного мупіроцину. Пізніше експериментально було продемонстровано багатообіцяючу цитотоксичність щодо меланоми та декількох

інших ракових клітинних ліній та антиметастатичну активність. Обидва антибіотики виявляли спорідненість до обраних ракових білків. Енергія зв'язування була порівнянна зі значеннями, зареєстрованими відомими та активними інгібіторами. Мупіроцин показав істотну афінність до протеїну Act1. Блокування активного центру MDM2p53 лігандами потенційно може відновити апоптоз у ракових клітинах. Інгібування протеїнкінази Act1 порушує сигнальний шлях (PI3K)-Akt, який відіграє ключову роль у зростанні та проліферації клітин, і, як правило, гіперактивується в ракових клітинах.

Батумін був пов'язаний з амінокислотами в активних центрах цільових білків шляхом створення водневих та гідрофобних зв'язків. У випадку з мупіроцином було більше водневих зв'язків через більш високий рівень окислення молекули. Молекула мупіроцину містить 9 атомів кисню (29% від молекулярної маси) та 43 атоми водню. У батуміні є 7 атомів кисню (21% молекулярної маси) та 48 атомів водню. Крім того, і мупіроцин, і батумін можуть створювати міцні електростатичні зв'язки з позитивно зарядженими амінокислотами за допомогою карбоксильних груп на кінцях 9-гідроксинанової кислоти цих молекул.

Афінність мупіроцину до ферментативних центрів білків, пов'язаних з раком, вказує на можливу протиракову активність, аналогічну тій, що повідомляється для батуміну. Однак слід зазначити, що мупіроцин вплинув на клітини HaCat більшою мірою порівняно з раковою клітинною лінією UCT Mel-1 на відміну від батуміну, який чинив значно більш помітний вплив на клітини меланому.

Різноманісна активність полієнових антибіотиків може бути пояснена гнучкістю та пластичністю їх молекул. Комп'ютерне моделювання просторових організацій молекул виявило 96 стійких конформацій мупіроцину та 199 конформацій батуміну. Тому специфічна активність проти цільових білків ракових пухлин може бути пояснена певним варіантом з багатьох можливих конформацій молекули антибіотиків [7].

1.2. Стафілококові інфекції

Staphylococcus aureus відноситься до сімейства *Micrococcaceae* – це грам позитивні бактерії, які є компонентом природної мікрофлори людини, проте іноді загрожують життю як патогенний мікроорганізм [8]. Крім того, стафілококи є в навколишньому середовищі: у повітрі, на поверхні ґрунту, у воді. Близько 20% населення – постійні носії золотистого стафілокока, при цьому бактерія не викликає в них ніяких симптомів.

В разі зниження реактивності імунної системи стафілококи стають збудниками різних захворювань. У деяких випадках стафілококова інфекція може вражати внутрішні органи, викликаючи сепсис, менінгіт, перитоніт, ендокардит, пневмонію, ангіну та інші захворювання. У маленьких дітей золотистий стафілокок може викликати хворобу Ріттера, яку ще називають «синдромом опшарених немовлят» (шкіра дитини вкривається пухирями, як після термічного опіку).

За даними ВООЗ, стафілокок очолює список бактерій, якими найчастіше заражаються в медичних установах розвинених країн. У лікарнях США реєструється понад 100 тисяч випадків інфікування стафілококом на рік, багато які зі смертельним результатом. Усього на стафілокок припадає 31% усіх випадків інфекцій, отриманих у госпіталах.

Інкубаційний період стафілококової інфекції триває від 2 до 5 діб (крім гастроентероколітів). Найчастіший і перший прояв – ураження шкіри, які проявляються у вигляді гнійничкових висипань. Гнійничковий висип може з'являтися в різних місцях [9].

Окрім здатності обходити захист імунної системи, мультирезистентні фенотипи є одними з найбільш непереборних патогенних бактерій в історії антибіотикотерапії. Золотистий стафілокок набув резистентності до практично всіх антибіотиків, які розроблялися з 1940-х років. У 1961 році серед клінічних ізолятів *S. aureus* було виявлено перші MRSA (метицилін-резистентний *S. aureus*). Тоді MRSA переважав у всьому світі як мультирезистентний лікарняний збудник. У 1997 р. виділили штам MRSA Mu50 зі зниженою сприйнятливістю до ванкоміцину.

Ванкоміцин-проміжний *S. aureus* (VISA), названий так відповідно до критеріїв CLSI, був продуктом адаптаційної мутації *S. aureus* проти ванкоміцину [8].

Набуття резистентності до багатьох антибіотиків в *S. aureus* передбачає придбання детермінант горизонтальним перенесенням генів мобільних генетичних елементів. Резистентність також може виникнути внаслідок мутацій, що змінюють місця зв'язування лікарського засобу на молекулярних мішенях та шляхом посилення експресії ендогенних насосів витікання. Розвиток резистентності за допомогою мутації в принципі може бути зменшений, використовуючи комбінації інгібіторів, які націлюються на різні ділянки. Стійкість до ванкоміцину вимагає до шести мутацій у різних генах, які призводять до реконструкції клітинної оболонки для зменшення доступу лікарських засобів до летальної мішені [10].

Стійкість патогенних мікроорганізмів до протимікробних препаратів продовжує швидко поширюватися по всьому світу. Перед COVID-19 передбачалося, що стійкість до антибіотиків щороку вбиватиме майже 700 000 людей у всьому світі [11]. Наразі ця кількість зростає на фоні пандемії через вторинні бактеріальні інфекції. Чжоу та його колеги у своєму дослідженні [12] виявили, що серед 191 пацієнта з COVID-19 бактеріальні вторинні інфекції мали місце у 15% серед усіх випадків, що є значною кількістю в абсолютних числах враховуючи масштаби пандемії. При дослідженні вторинних інфекцій під час пандемії [13] автори описали перебіг інфікування у різних клінічних групах (безсимптомно та легко, помірно та важко). Бактеріальні вторинні інфекції, такі як *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*, були виявлені у всіх чотирьох клінічних групах [14].

За останні 30 років була впроваджена зовсім незначна кількість антибіотиків, що являють собою нові хімічні класи. Тому наразі актуальними є дослідження і розробка нових лікарських засобів з новими механізмами дії для боротьби зі стафілококовими інфекціями.

1.3. Полікетидні антибіотики та їх похідні

Полікетиди представляють надзвичайно різноманітну групу природних сполук, що мають складні і різноманітні за структурою вуглецеві скелети. Полікетиди можна умовно розділити на: поліфеноли, макроліди, полієни, ендієни та поліефіри. Хоча їх точна роль в початковому біологічному контексті відома не у всіх випадках, вважається, що вони виконують функції пігментів, факторів вірулентності або мають захисні функції [15].

З фармакологічної точки зору полікетиди є важливим джерелом нових терапевтичних засобів. Зокрема, вони використовуються в медицині переважно як антибіотики, імунодепресанти, антипротозойні засоби, знижувачі рівня холестерину та протипухлинні засоби [16]. Складні структури молекул полікетидів та їх суттєва значимість для фармакології спонукають дослідників до ретельного вивчення шляхів біосинтезу даних антибіотиків та їх похідних. Відзначимо, що незважаючи на хімічну різноманітність і складність полікетидів, біосинтез антибіотиків відбувається полімерізацією простих біосинтетичних блоків – ацетильних і пропільних груп та нагадує синтез жирних кислот.

З моменту перших міркувань щодо біосинтезу від Коллі, який ввів термін полікетид, та «ацетогенінової» гіпотези Бартонна [17] природне різноманіття зв'язування та синтезу із простих мономерів карбонової кислоти стала захоплюючою міждисциплінарною областю досліджень. З появою молекулярних технологій [18] тепер стало можливим краще зрозуміти біосинтетичну логіку різноманітності полікетидів. На основі цього зростаючого обсягу знань шляхи біосинтезу полікетидів можуть бути детально проаналізовані та передбачені, також можна робити припущення про природу побічних продуктів біосинтезу полікетидів [19–22].

Як зазначалося, біосинтез полікетидів має багато спільного з біосинтезом жирних кислот. Вони схожі не тільки за хімічними механізмами, що беруть участь у подовженні ланцюга, але й у загальному пулі простих попередників, таких як ацетилкофермент А (CoA) та малоніл-CoA (MCoA) [23]. Як правило, і полікетиди,

і жирні кислоти конструюються шляхом повторюваних декарбоксилюючих тіоефірних конденсацій Клізена активованої ацильної стартерної установки з подовжувачами, отриманими з малоніл-КоА (рис. 1.3). Як правило, цей процес включає β -кетואцилсинтазу (KS), необов'язково (малоніл) ацилтрансферазу (MAT / AT) та фосфопантетієнільований ацильний білок-носії (ACP) або кофермент А (CoA), який служить якорем для нарощування ланцюгів. Після кожного подовження ланцюга функціональна β -оксо група обробляється кеторедуктазою (KR), дегідратазою (DH) та еноїлредуктазою (ER), що дає повністю насичений ацильний скелет.

Однак біосинтез полікетидів багато в чому відрізняється від біосинтезу жирних кислот. Полікетидні синтази (PKS) чітко відрізняються від синтаз жирних кислот (FAS) не тільки своєю здатністю використовувати ширший спектр біосинтетичних будівельних блоків, але й утворенням різної довжини ланцюга. Найголовніше, тоді як FAS зазвичай каталізують повний відновний цикл після кожного подовження, у біосинтезі полікетиду відновлювальні етапи є необов'язковими; вони можуть бути частково або повністю опущені до наступного раунду подовження, що породжує більш складну схему розташування функціональних груп скелету (Рис. 1.3). Тим не менше, в обох шляхах цикли подовження / відновлення повторюються, поки не буде отримана визначена довжина ланцюга, і, нарешті, пов'язані з тіоестером субстрати звільняються від ферментного комплексу. Потім первинні продукти можуть зазнати додаткових модифікацій. Незважаючи на вражаючу подібність у своїй ензимології у подовженні ланцюгів, PKS та FAS [24] різні і становлять метаболічну точку розгалуження між первинним та вторинним метаболізмом. Обидва шляхи могли розходитися на ранній стадії під час еволюції. Незважаючи на це, у цьому контексті може бути цікавим зауважити, що PKS можуть брати участь у біосинтезі мікробних поліненасичених жирних кислот [25, 26], а також ліпідів мікобактеріальних клітинних стінок [27].

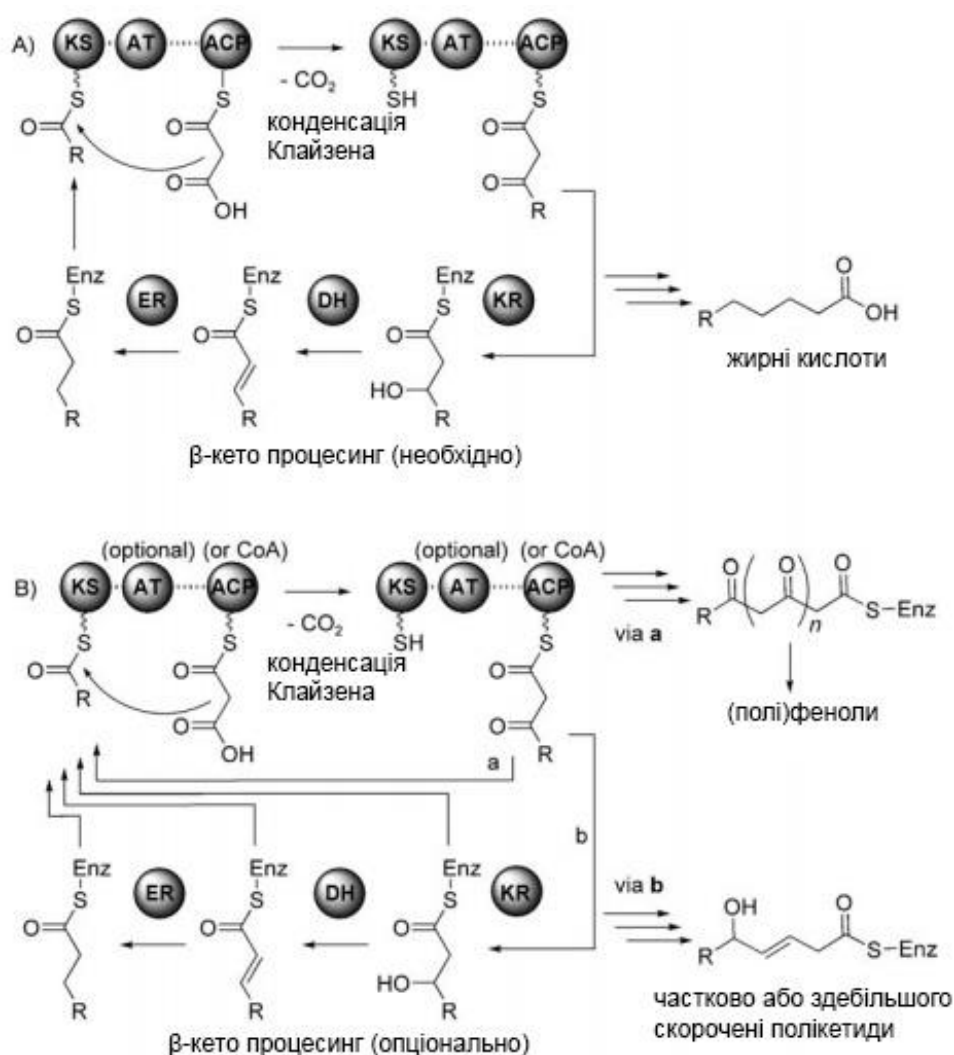


Рис. 1.3. Основні механізми біосинтезу жирних кислот (А) та полікетидів (В)
Enz – фермент [15]

Біосинтетичні шляхи полікетидів досить складно вивчати, крім того, більшість досліджень фокусувалось на основному цільовому полікетиді. Проте в дослідженні полікетидного антибіотику бацілаєну із культуральної рідини *B. amyloliquefaciens* CH12 було знайдено також споріднену похідну сполуку (рис. 1.4). При більш детальному вивченні, дослідники дійшли висновку, що похідна сполука є продуктом того ж самого біосинтетичного шляху (рис. 1.5) [28].

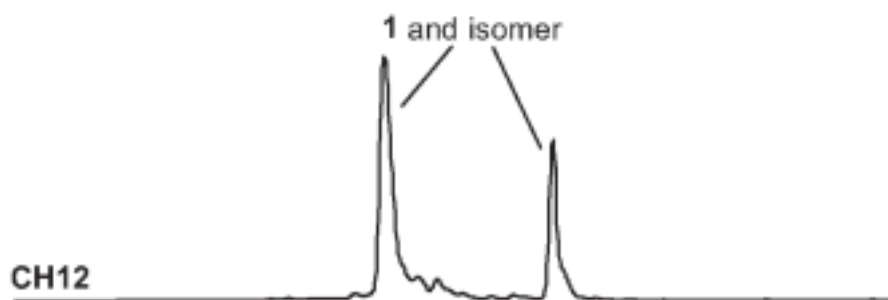


Рис. 1.4. ВЕРХ екстракту *B. amyloliquefaciens* CH12 [28]

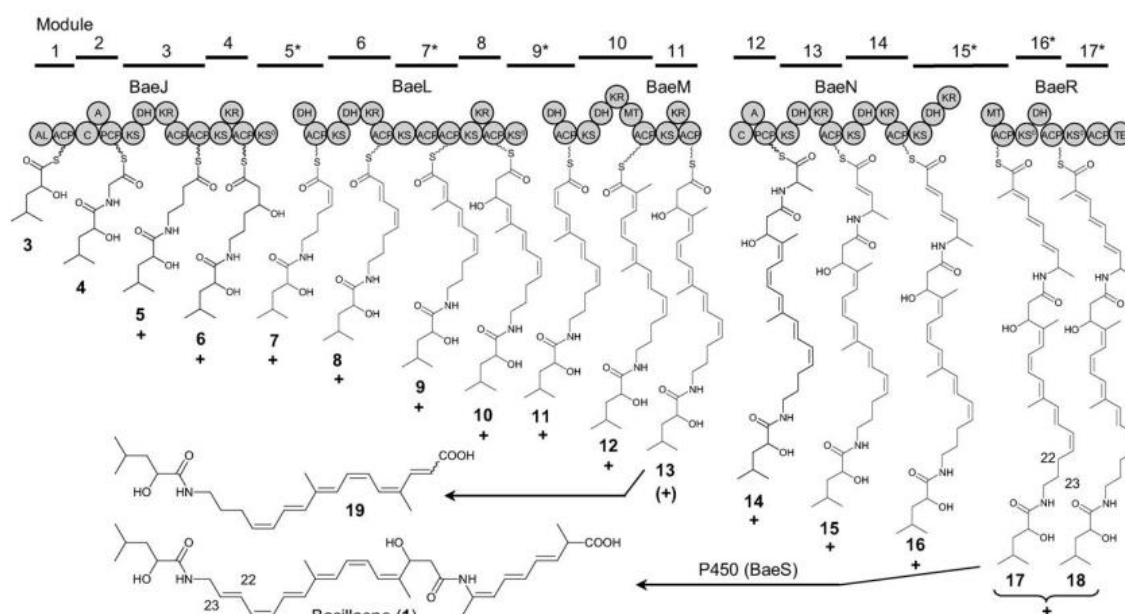


Рис. 1.5. Біосинтетичний шлях бацилаєну (1), сполука 19 – похідне з даного біосинтетичного шляху [28]

Антибіотик батумін, який синтезує *P. batumici* В-321 також полікетидної природи. Було показано, що оперон, відповідальний за біосинтез батуміну, є значним за своїми розмірами і містить 28 кодуючих генів [6]. Крім того, молекула антибіотика є багатофункціональною і здатною утворювати ізомерні форми [29]. Виходячи з цього, ми зробили припущення про наявність у культуральній рідині *P. batumici* УКМ В-321 ряду похідних батуміну з можливою антибіотичною активністю.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1.1. Умови підтримання і зберігання штаму-продуценту

Об'єктом дослідження був типовий штам *Pseudomonas batumici* УКМ В-321 з Української колекції мікроорганізмів, підтримуваний у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Штам зберігали у ліофілізованому стані при $t = +5-10^{\circ}\text{C}$, а також на 0,5 % м'ясо-пептонному агарі під шаром вазелинової олії при кімнатній температурі.

Для роботи використовували штам-продуцент *P. batumici* В-321, який попередньо відсівали на скошене середовище МПА і вирощували 24 год при 26°C . Далі культура зберігалась у холодильнику за $t = +5\div 8^{\circ}\text{C}$ з частотою пересіву – один раз на 7-12 днів.

2.1.2. Визначення антагоністичних властивостей

Для визначення антагоністичної активності використовували метод радіальних штрихів. Для цього добову культуру *P. batumici* УКМ В-321 висівали на середину чашки Петрі з МПА та середовищем Гаузе №2 у трьох повторях (діаметр зони засіву 15 мм). Культуру продуцента пророщували 72 год при 28°C . Після чого на чашки наносили радіальними штрихами тест-штами мікроорганізмів у вигляді суспензії добових культур методом виснажуючого штриха, стандартизованих за стандартом каламутності №10, що відповідає суспензії з концентрацією 10^9 кл/мл. Як тест-штами використовували: *Escherichia coli* В-926, *Staphylococcus aureus* В-918, *Bacillus subtilis* В-901, *Pseudomonas aeruginosa* В-900 та *Candida albicans* Y-2681. Після підсихання, чашки з нанесеними тест-штамами культивували 24 години в термостаті при температурі 37°C , після чого проводили облік зон затримки росту тест-штамів в мм.

2.1.3. Культивування штаму *P. batumici* УКМ В-321 та визначення його антибіотичних властивостей

Для визначення антибіотичної активності культуральної рідини штаму *P. batumici* УКМ В-321 вирощували на синтетичному поживному середовищі, яке містило глюкозу, сечовину, ортофосфат калію та ряд мікроелементів в умовах глибинного культивування, в колбах Ерленмейера протягом 96 год за температури 25°C. Отриману культуральну рідину розводили у 10, 100 і 1000 раз та вносили по 0,1 мл у лунки на чашках Петрі з МПА, засіяних тест-штамом *S. aureus* УКМ В-918 (концентрація 10^7 кл/мл). Після чого чашки пророщували у термостаті за температури 37°C протягом 24 год та вимірювали діаметри зони затримки росту.

2.1.4. Виділення антибіотичних сполук

Отриману культуральну рідину штаму *P. batumici* УКМ В-321 попередньо тричі екстрагували хлороформом у співвідношенні 2:1 відповідно. Екстракт осушували безводним сульфатом натрію та випарювали. Розділення екстрагованих речовин проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинах з силікагелем (Merck, США) в системі бензол-ізопропанол (5:1). Одну частину пластини проявляли в парах йоду, другу – розрізали на частини на рівні проявлених п'ятен.

2.1.5. Біоавтографія виділених сполук

Для біоавтографії був використаний диско-дифузійний метод на бактеріальному агарі. Як тест-штами використовували *S. aureus* В-918, *E. coli* В-926, *B. subtilis* В-901, *C. albicans* Y-2681. Тестові штами змішували з м'ясо-пептонним агаром, кінцева концентрація 10^7 клітин/мл в МПА. Відокремлені на силікагелевих пластинах сполуки наносили на чашки Петрі з бактеріальним агаром і поміщали в термостат при 37 °C. Зони затримки росту в мм вимірювали через 24 години.

2.1.6. Спектрометрія, рідинна хроматографія та мас-спектрометрія

Фізико-хімічну характеристику отриманих сполук проводили шляхом вимірювання спектрів поглинання (DeNovix DS-11 FX +), зразки готували в 96% етанолі. Молекулярні маси ідентифікували методом LC / MS (Agilent 1200, США, мас-спектрометричний детектор - Agilent G1956B). Хроматографічна система була такою: колонка XDB-C18 (Zorbax 150 мм × 4,6 мм × 5 мкм) з неполярною октадецильною групою (обернена фаза), рухома фаза - ACN: H₂O (55:45) та 0,5 М розчин ацетату амонію, температура колони становила 30 °С, швидкість потоку - 1 мл / хв, ізократичний режим, введення 5 мкл.

2.1.7. Виділення клінічних ізолятів *Staphylococcus*

Забір мікробіологічного матеріалу здійснювався згідно із пункту 2 Інструкції з організації роботи бактеріологічних лабораторій в системі інфекційного контролю, затвердженого наказом охорони здоров'я України 10.05.2007 N 234 (Загальні правила забору та транспортування матеріалу для проведення мікробіологічного дослідження) [30] зі шкіри потилиці голови у місцях абсцесу. Пацієнт надав інформовану згоду (Додаток А) на забір, зберігання та дослідження біологічного матеріалу.

2.1.8. Ідентифікація виділених клінічних штамів

Для ідентифікації виділених клінічних штамів використовували наступні методи:

- визначення морфології та забарвлення колоній

Суспензію добової культури наносили на чашку Петрі виснажуючим штрихом поряд із референс-штамом *Staphylococcus aureus* B-918. Після пророщування протягом 24 годин при 37 °С в термостаті, порівнювали колір та морфологію колоній.

- фарбування за Грамом з наступним мікроскопіюванням, використовуючи світловий мікроскоп Мікмед-1 (Ломо, Росія).

- біохімічна характеристика за допомогою тест-систем API Staph (Biomerieux, Франція)

В готову тест-систему вносили дистильовану воду і додавали суспензію клінічного штаму в поживному середовищі Staph Medium Biomerieux (склад: дріжджовий екстракт, пептон, NaCl, мікроелементи) із концентрацією клітин за стандартом МакФарланда 0,5 ($1,5 \times 10^8$ клітин/мл). Заповнену тест-систему культивували 24 години в термостаті при 37 °С. Результати аналізували одразу після пророщення в термостаті згідно із таблиць, які надав виробник тест-систем (Додаток Б, Додаток В).

- визначення спектру чутливості до антимікробних засобів

Чутливість клінічних штамів до антимікробних засобів визначали диско-дифузійним методом. Суспензію штаму в концентрації 1×10^7 клітин/мл вносили на поверхню МПА і шпателем розподіляли по поверхні поживного середовища. Після підсихання суспензії розкладали стандартні диски із антибіотиками на поверхню агару із суспензією, чашки пророщували 24 години при 37 °С після чого вимірювали зони затримки росту в мм і робили висновок про чутливість/часткове пригнічення/резистентність штамів до даного антибіотику. Використовували диски із наступними антибіотиками (в концентрації 5мкг): амоксицилін, доксоциклін, тетрациклін, левоміцетин, фузидін, сульфатіазол, мупіроцин.

- діагностика препаратом «Діастаф»

«Діастаф» призначений для виявлення стафілококів в клінічних, ветеринарних і науково-дослідних установах [31]. Даний препарат не впливає на розвиток мікроорганізмів інших таксонів і забезпечує експрес-діагностику стафілококів в змішаних культурах. Використання дисків «Діастаф» (протягом 18 год) дозволяє диференціювати стафілококи за зоною затримки росту від інших грампозитивних коків, нечутливих до препарату.

Суспензію клінічного штаму в концентрації 1×10^7 клітин/мл вносили на поверхню МПА і шпателем розподіляли по поверхні поживного середовища. Після підсихання суспензії «Діастаф» наносили на поверхню агару, чашки пророщували

24 години при 37 °C після чого вимірювали зони затримки росту в мм і робили висновок. Згідно інструкції до препарату, зона затримки росту діаметром 17-40 мм навколо диску свідчить про наявність представників роду *Staphylococcus*.

Аналізували всі отримані результати і робили висновок про видову приналежність отриманих клінічних штамів для подальшого використання їх у якості тест-штамів в даній роботі.

2.1.9. Обробка отриманих даних

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмних пакетів Microsoft Excel та Statistica v.10 (StatSoft, Inc., 2011). Різницю між середніми значеннями оцінювали за допомогою t-критерію і вважали достовірною при $p \leq 0,05$.

2.2. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

2.2.1. Антагоністичні властивості штаму *P. batumici* УКМ В-321

Нами було встановлено, що антагоністичні властивості штаму *P. batumici* УКМ В-321 найбільш активно проявляються при культивуванні на твердому середовищі Гаузе №2 (рис. 2.1).

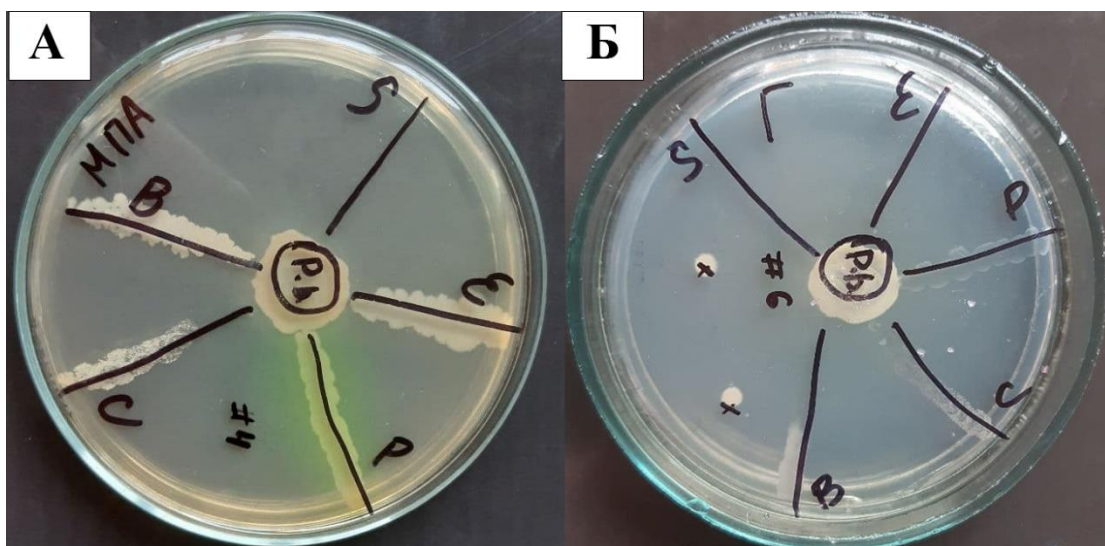


Рис. 2.1. Антагонізм *P. batumici* УКМ-321 по відношенню до тест-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів на різних поживних середовищах. А – антагонізм на м'ясо-пептонному агарі, Б – антагонізм на середовищі Гаузе №2. P.b. – штам *P. batumici* В-321, S – *S. aureus* В-918, E – *E. coli* В-926, P – *P. aeruginosa* В-900, C – *Candida albicans* Y-2681, B – *B. subtilis* В-901

Зони затримку росту на середовищі Гаузе №2 були більшими, ніж при вирощуванні продуценту на МПА, за винятком значень для *C. albicans*. Зони затримки росту наведено в таблиці 2.1 для експерименту із двома повторами.

Отримані результати були неоднозначними для *E. coli*, майже повне пригнічення спостерігалось на середовищі Гаузе, в той час як для МПА пригнічення було невеликим. Це можна пояснити низкою факторів, наприклад, кишкова паличка гірше росте на середовищі Гаузе, ніж на МПА, або виділення та дифузія антибіотичних сполук продуцентом краще спостерігається на середовищі Гаузе. Невелике пригнічення росту для *B. subtilis* спостерігалось вперше.

Раніше було встановлено, що антибіотик батумін не пригнічує штами *C. albicans*. В той же час, штам-продуцент батуміну характеризувався антагоністичною активністю відносно *C. albicans* Y-2681 – зона затримки росту становила 11 мм. Це можна пояснити тим, що *P. batumici*, окрім батуміну, також здатний синтезувати феназин-1-карбонову кислоту – пігмент, активний по відношенню до *C. albicans* та інших представників мікроскопічних грибів [32].

Таблиця 2.1. Зони затримки росту тест-штамів на середовищах МПА і Гаузе №2 у двох повторях

Номер чашки	Середовище	Тест-штами, зони затримки росту в мм				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1	МПА	1	ПП	1	0	11
2	МПА	1	ПП	1	1	2
1	Гаузе	21	ПП	1	0	0
2	Гаузе	ПП	ПП	2	2	1

ПП – повне пригнічення росту

Результати спонукали нас до більш детального вивчення антибіотичної активності культуральної рідини *P. batumici* УКМ В-321, вирощеного в умовах періодичного культивування.

2.2.2. Визначення антибіотичної активності культуральної рідини штаму *P. batumici* УКМ В-321

При вирощуванні *P. batumici* УКМ В-321 – штаму-продуценту антистафілококового антибіотика батуміну, отримана нами культуральна рідина була перевірена щодо своєї активності до тест-штаму *S. aureus* УКМ В-918 (рис. 2.2).

У результаті дослідів було встановлено, що культуральна рідина штаму *P. batumici* УКМ В-321 здатна пригнічувати ріст стафілококів у всіх трьох розведеннях. Так, зони затримки росту *S. aureus* УКМ В-918 становили 32, 25 та 15 мм при розведеннях 1:10, 1:100 і 1:1000 відповідно.

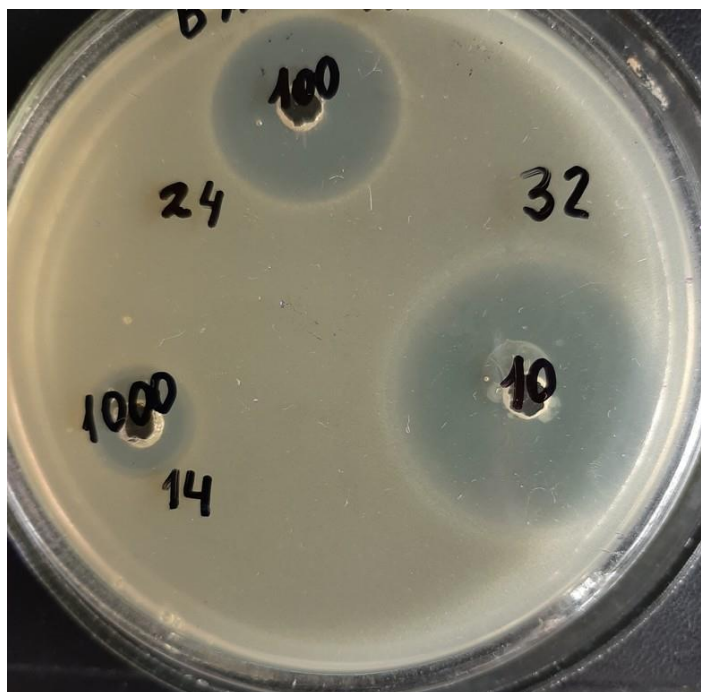


Рис. 2.2. Зони затримки росту *S. aureus* УКМ В-918 за різних розведень культуральної рідини штаму *P. batumici* УКМ В-321 (10, 100, 1000 – кратність розведення)

Така висока активність проти *S. aureus* характеризує штам *P. batumici* УКМ В-321 як перспективний продуцент для отримання антибіотика з антистафілококовою дією. Виділення антибіотичних сполук в культуральну рідину спрощує подальшу їх екстракцію.

2.2.3. Виділення та аналіз сполук *P. batumici* УКМ В-321 антибіотичної природи

Синтез штамом *P. batumici* УКМ В-321 антибіотика батуміну та його антистафілококова активність була охарактеризована раніше рядом авторів [4]. Однак ми вважали за необхідне провести більш широкий аналіз культуральної рідини штаму-продуценту на наявність в ній, можливо, інших антибіотичних сполук. Методом тонкошарової хроматографії було проведено розділення сполук, отриманих при культивуванні *P. batumici* УКМ В-321 (рис. 2.3).

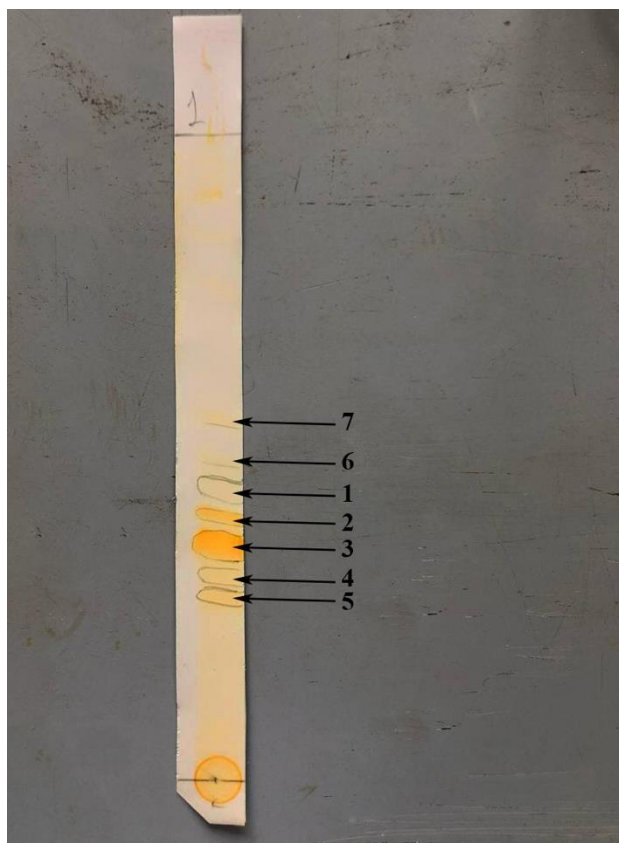


Рис. 2.3. Хроматографія екстракту культуральної рідини штаму *P. batumici* УКМ В-321

Аналіз екстракту культуральної рідини штаму *P. batumici* УКМ В-321 показав наявність в ній семи окремих сполук з різними значеннями факторів розділення: $Rf_1 = 0,42$; $Rf_2 = 0,38$; $Rf_3 = 0,31$; $Rf_4 = 0,28$; $Rf_5 = 0,25$; $Rf_6 = 0,45$; $Rf_7 = 0,48$. Попередні експерименти із розділенням екстракту на пластинах показали, що сполуки 2-5 мають антибіотичну активність і проявляються в парах йоду найяскравіше. Після зберігання спиртового розчину і повторного проведення тонкошарового розділення на пластині можна було побачити вже сім сполук як на рисунку 2.3. Це можна пояснити встановленою рівновагою між таутомерними ізомерами із часом.

За попереднім аналізом було висловлено припущення, що сполука №1 також буде проявляти антибіотичну активність, як і №2 або трохи нижчу. Сполуки №6 та №7 гіпотетично вважались попередниками біосинтезу основного антибіотика, що не будуть проявляти антибіотичну активність. Скринінг сполук №6 та №7 (рис.2.4)

довів висловлену гіпотезу.

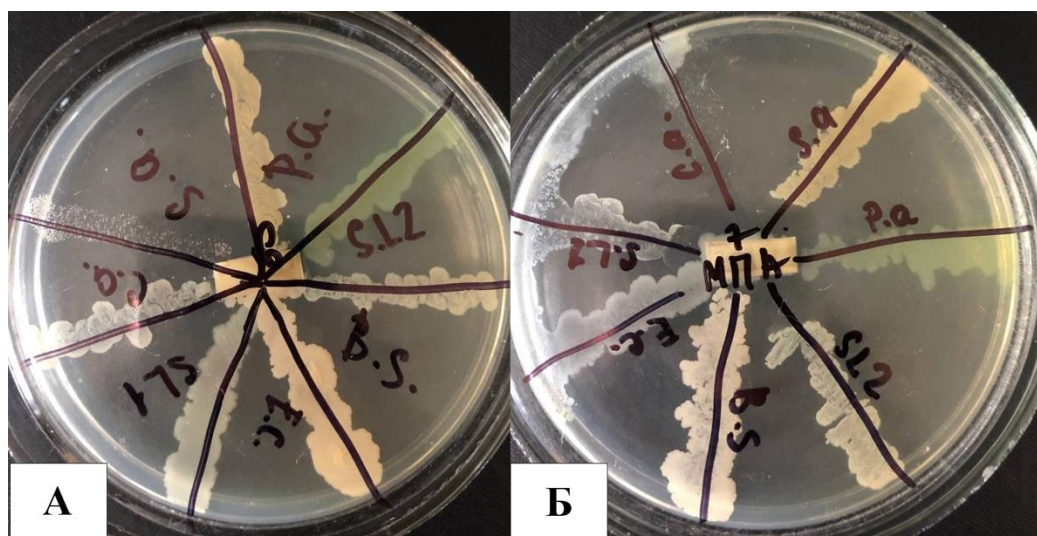


Рис. 2.4. Скринінг розділених сполук №6 (А) та №7 (Б) на наявність антибіотичної активності по відношенню до штамів: *Escherichia coli* B-926, *Staphylococcus aureus* B-918, *Bacillus subtilis* B-901, *Pseudomonas aeruginosa* B-900, *Candida albicans* Y-2681 та двох клінічних штамів *Staphylococcus spp.* L1, *Staphylococcus spp.* L2

Дані сполуки практично не проявляють антибіотичної активності щодо тестових умовно-патогенних штамів та клінічних штамів. Невеликі зони затримки росту біля сьомої сполуки є незначними, і, враховуючи малі концентрації даних сполук при розділенні екстракту на хроматографічній пластині біло зроблено висновок, що варто зосередити увагу на дослідженні сполук №1-№5, що і було зроблено.

2.2.4. Біоавтографія виділених сполук

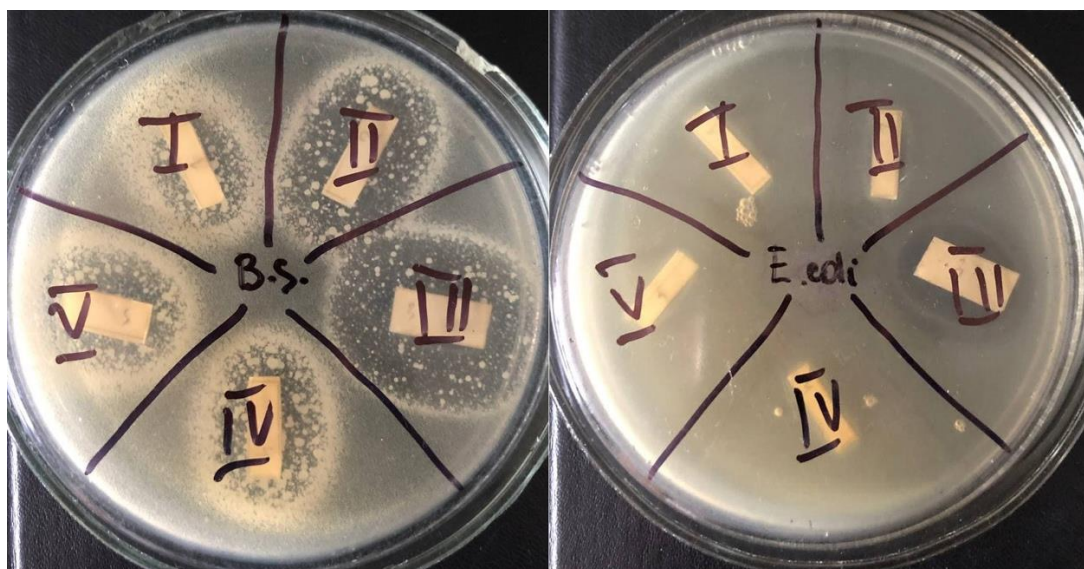
Наступним етапом роботи стала перевірка кожної окремої сполуки на здатність пригнічувати тест-штами умовно-патогенних мікроорганізмів та двох виділених клінічних штамів (рис. 2.5). Біоавтографія отриманих сполук дала наступні результати (таблиця 2.2).

Таблиця 2.2. Зони затримки росту тест-штамів сполуками №1-№5 з екстракту культуральної рідини *P. batumici* УКМ В-321

Тестовий штам	Номер сполуки, зона затримки росту в мм				
	№1	№2	№3	№4	№5
<i>Bacillus subtilis</i> B-901	0 (15)	0 (23)	0 (30)	0 (19)	0 (21)
<i>Escherichia coli</i> B-926	0	0	16	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-900	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> Y-2681	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> B-918	17	26	39	25	26
<i>Staphylococcus</i> spp. L1	20	30	40	30	32
<i>Staphylococcus</i> spp. L2	23	30	40	30	35

Сполука №3 не тільки мала Rf, що відповідає значенню для батуміну, але і виявилася самою активною серед інших по відношенню до *S. aureus* B-918 (зона затримки росту становила 39 мм). Також третя сполука характеризувалася помірною активністю (16 мм) до *E. coli* B-926, що також властиво для батуміну. Ці дані дозволили попередньо ідентифікувати сполуку №3 як антибіотик батумін.

Жодна зі сполук не діяла ні на *P. aeruginosa* B-900, ні на *C. albicans* Y-2681. При цьому дія на штам *Bacillus subtilis* B-901 була іншого характеру, спостерігали зони затримки росту, із одиничними колоніями всередині зон. Раніше автори [5] проводили дослідження спектру дії антибіотика батуміну, і за їх даними батумін (який попередньо ідентифіковано під номером 3) не діє *in vitro* на *B. subtilis*.



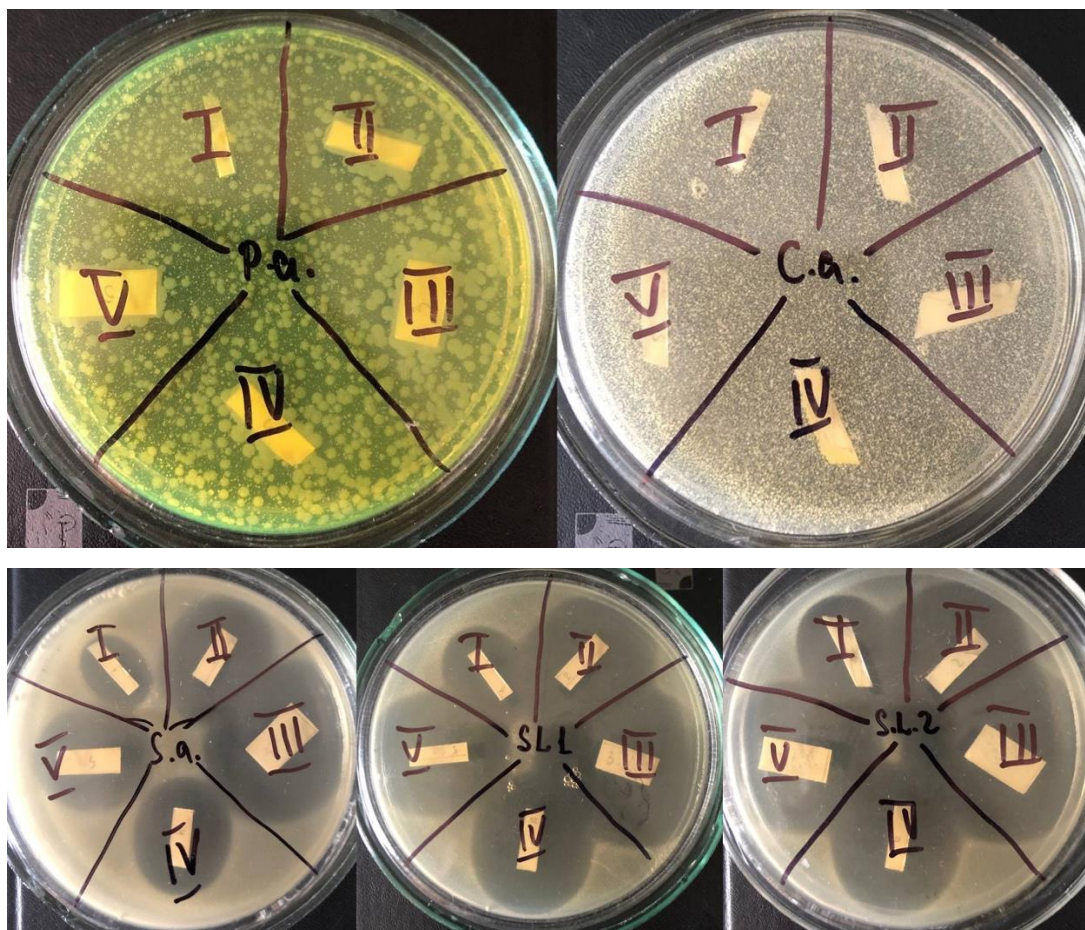


Рис. 2.5. Біоавтографія сполук, виділених з екстракту культуральної рідини штаму *P. batumici* УКМ В-321: I, II, III, IV, V – номери сполук римськими цифрами, що відповідають сполукам №1-№5 зі значеннями Rf 0,42; 0,38; 0,31; 0,28; і 0,25 відповідно; B.s. – *Bacillus subtilis*, E. coli – *Escherichia coli*, P.a. – *Pseudomonas aeruginosa*, C.a. – *Candida albicans*, S.a. – *Staphylococcus aureus*, SL1 – *Staphylococcus* spp. L1, SL2 – *Staphylococcus* spp. L2

Дія, яку можна спостерігати на рис. 2.5 може казати про вплив екстрагованих сполук не на клітину бацил, а на міжклітинну взаємодію штаму та характер росту колоній. Відомо, що при рості на щільних поживних середовищах бацили утворюють характерну плівку, крім того, колонії цього мікроорганізму є гідрофобними, що, до речі, ускладнює роботу дослідника при приготуванні бактеріальної суспензії. Ця властивість виділяє *B. subtilis* серед інших тест-штамів на яких проводили дане дослідження. Японські дослідники Фуджикава та Мацушита у своїй роботі [33] дослідили залежність морфології росту *Bacillus*

subtilis на щільних поживних середовищах на чашках Петрі від складу субстрату та вологості поверхні поживного середовища і показали, що для цього виду морфологія колоній та характер росту на чашці буде відрізнятися значним чином. Наприклад, на підсушених чашках з МПА бацили росли у вигляді сніжинок, спочатку формуючи опуклу колонію, з якої згодом виростали «дендрити» (рис. 2.6).

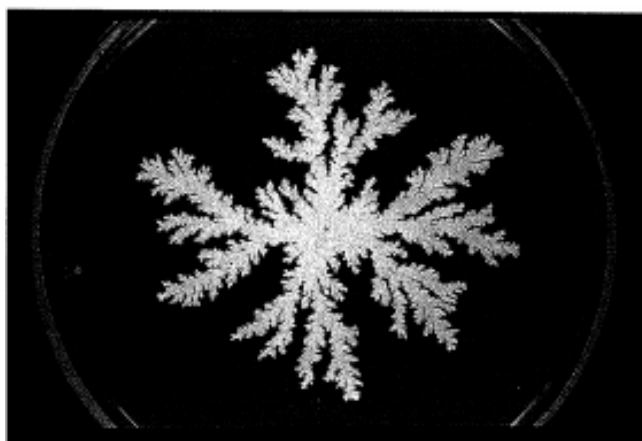


Рис. 2.6. Ріст *Bacillus subtilis* на підсушених чашках з МПА (нанесення на поверхню чашки всередині), фото через 20 днів після інокуляції [33]

При значній вологості, колонія росла радіально, без відростків, формуючи майже ідеальне коло (рис. 2.7).

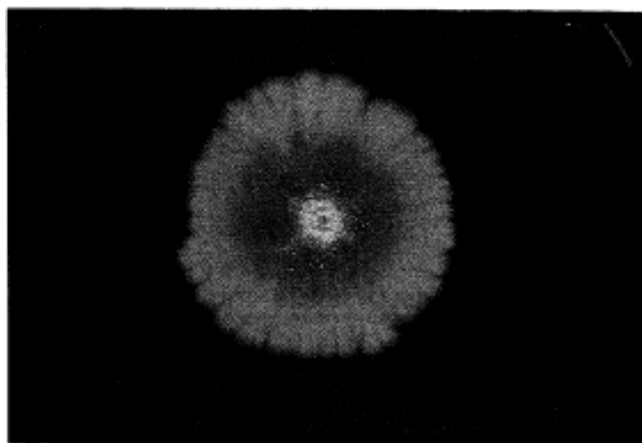


Рис. 2.7. Ріст *Bacillus subtilis* на вологих чашках з МПА (нанесення на поверхню чашки всередині), фото через 20 днів після інокуляції [33]

В нашому експерименті суспензію бацил вносили в товщу МПА, що дає іншу

форму колоній, за зонами дії екстрагованих сполук *Bacillus subtilis* B-901 росте практично однорідним моношаром. В зонах дифузії сполук в МПА, бацили змінюють морфологію росту на чашці і вона схожа на характер росту *Pseudomonas aeruginosa*. Можливо, батумін та інші екстраговані сполуки зв'язуються із поверхневими білками *Bacillus subtilis* B-901, що не дає штаму рости моношаром. Такими білками можуть бути лектини *B. subtilis*: відомо, що синтез поверхневої форми лектину проходить перші 24 години росту, після чого штам синтезує переважно розчинні лектини [34].

З іншої сторони, всі п'ять сполук батумінової природи проявляли однакову якісну дію на характер росту бацил, тому не виключено, що дія на міжклітинні зв'язки є не специфічною, як повинна бути при взаємодії батумінів із лектинами, і пов'язана із загальною властивістю молекули – її зарядом. За своєю природою батумін є (2E, 10Z, 12E)-20-(3-амінокарбокси-2-метил-1-оксобутил)аміно-7-метилен-17-оксо-19-окси-3,5,15-триметилейкоза-2,10,12-триєн кислотою [35], тобто в розчинах молекула може перебувати у вигляді аніону.

Про клітини *Bacillus subtilis*, в свою чергу відомо, що вони несуть переважно негативний заряд і здатні селективно адсорбувати на своїй поверхні метали, завдяки наявності тейхоєвих кислот у бактеріальній стінці, фосфодіефірні групи тейхоєвої кислоти беруть участь у зв'язуванні магнію [36], залізо та оксиди алюмінію електростатично зв'язуються із бактеріальною поверхнею, а адсорбція аніону діоксиду кремнію на амінних функціональних групах поверхні клітини *B. subtilis* може відповідати за концентрацію кремнію бактеріями. У присутності водних катіонів Fe та Al ця здатність бацил навіть підвищується [37]. Дослідники також спостерігали значну адсорбцію урану, що існує в навколишньому середовищі переважно у вигляді негативно заряджених уранілових комплексах, на поверхні бактерій за широкого діапазону навколишніх умов (різний рН та концентрації вуглекислого газу). Термодинамічне моделювання даних дозволило припустити, що уранілгідроксид, ураніл-карбонат та уранілкарбонат кальцію можуть утворювати стабільні поверхневі комплекси на клітинній стінці бактерії [38].

Існує лінійна кореляція між відносним негативним зарядом на поверхні бактеріальної клітини *B. subtilis* та прикріпленням її до м'язової тканини яловичини та жирової тканини, гідрофобність корелює із здатністю бацил прикріплюватися до жирової тканини [39].

Також, важливо зазначити, що в геномі *B. subtilis* знайдені оперони *dlt*, і *pssA*, що кодують ферменти, які модулюють поверхневий заряд клітини (D-аланілювання тіхоєвої кислоти та біосинтез фосфатидилетаноламіну відповідно), при їх вивченні дослідники прийшли до думки, що однією з їх функцій є регулювання модифікації поверхні клітини як захист від катіонних антимікробних пептидів [41]. Не виключено, що *B. subtilis* має й інші механізми захисту від антибіотичних речовин, хоча на нашу думку більш ймовірною є неспецифічна електростатична взаємодія клітин бацил із батуміном та його похідними, через те, що дані молекули також несуть в собі заряд.

Всі п'ять сполук активно діяли на тест-штам *Staphylococcus aureus* B-918 та 2 клінічні штами *Staphylococcus spp.*, батумін проявляв найвищу активність, при чому зони затримки росту на клінічних штамах були на 14-17% більшими для сполук №1, №2, №4, №5. Сполука №1 мала найменшу зону затримки росту серед усіх екстрагованих.

Попередньо, сполуки вважали за похідні батуміну через специфічну дію на стафілококи.

Цікавим виявився результат біоавтографії на *Escherichia coli* B-926 – зона затримки росту середнього розміру (16 мм) була лише для батуміну, у той час як інші сполуки не проявляли антибіотичної дії. Ця особливість буде врахована при остаточній ідентифікації розділених сполук після вимірювання мас-спектрів та максимумів поглинання досліджуваних сполук.

2.2.5. Спектрометрія, рідинна хроматографія та мас-спектрометрія виділених сполук

Фізико-хімічну характеристику отриманих сполук проводили за максимумами поглинання (рис.2.8) та мас-спектрами (рис. 2.9).

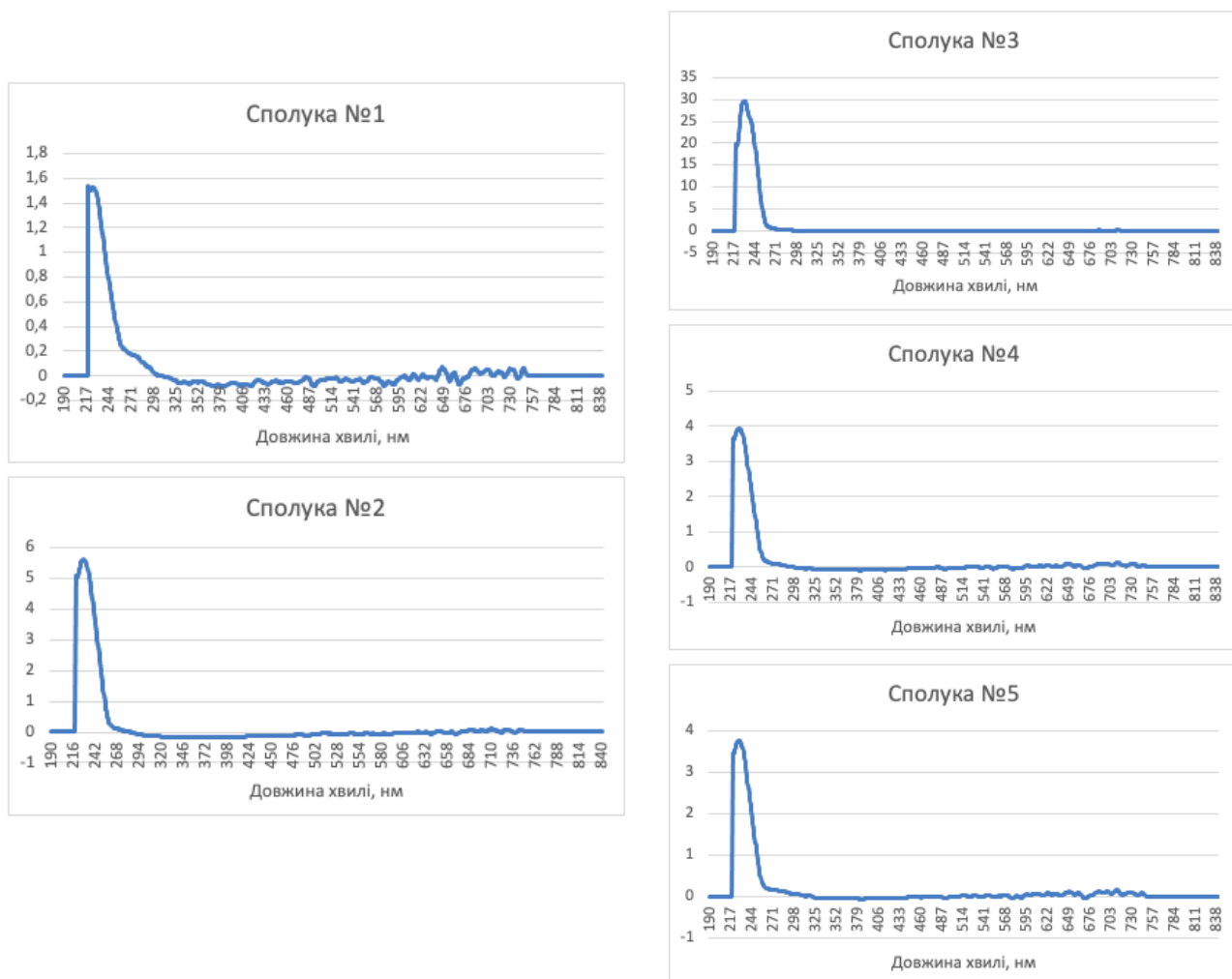


Рис. 2.8. Окремі спектри поглинання сполук, екстрагованих із культуральної рідини *P. batumici* B-321

Спектри поглинання екстрагованих сполук знаходяться в ультрафіолетовому діапазоні, що дає змогу припустити, що всі п'ять сполук є спорідненої природи і є похідними батуміну (який попередньо ідентифікували під номером 3).

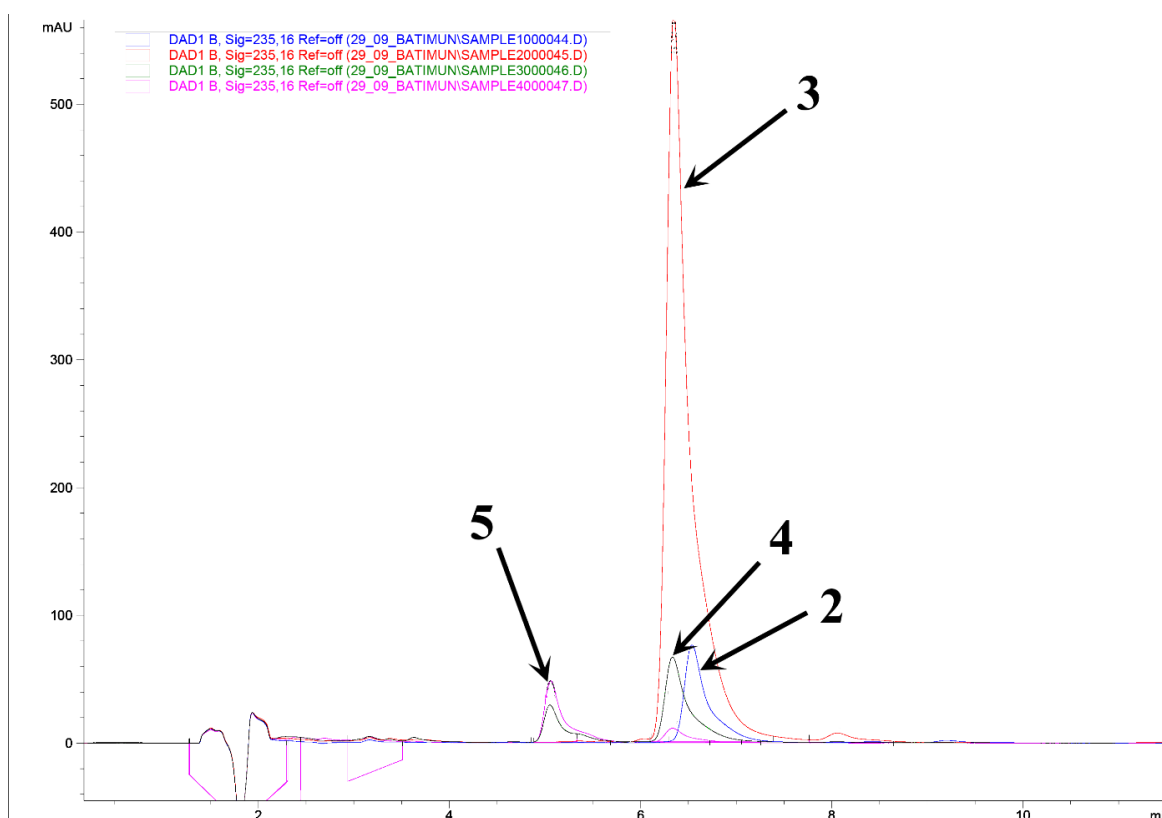


Рис. 2.9. Рідинна хроматографія екстрагованих сполук, піки зведені в один документ

Для кожного піку визначили молекулярну масу досліджуваної речовини. Молекулярну масу першої сполуки встановити не вдалося, через невелику кількість речовини в досліджуваному зразку. Загальна характеристика виділених сполук наведена в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3. Характеристика антибіотичних сполук, виділених з екстракту культуральної рідини *Pseudomonas batumici* B-321

Сполука	1	2	3	4	5
Назва сполуки	Дескарбамоїл батумін (енол)*	Дескарбамоїл батумін (кетон)	Батумін (кетон)	Батумін (енол)	17-гідрокси-батумін
Максимум поглинання, нм	226	231	231	228	229
Молекулярна маса	505*	505	548	548	550
Фактор розділення, Rf	0,42	0,38	0,31	0,28	0,25

Поглиблюючись у хімічні властивості знайдених речовин ми припустили, що дескарбамоїл-батумін повинен мати також і енольну форму, завдяки наявності в молекулі тієї ж ділянки, яка відповідає за таутомеризацію. П'ята сполука не мала ізомерів, що вказує на можливе місце окиснення – ділянку таутомеризації.

Експеримент з вибіркового нокаутування генів кластеру *kal/bat* (оперон, що відповідає за біосинтез батуміну) [41] показав, що попередником цільового продукту – батуміну – є речовина із масою 550. Ґрунтуючись на цих даних та отриманих нами результатах фізико-хімічної характеристики ми припускаємо, що це – 17-гідроксibatумін попередник батуміну в біосинтетичному шляху. Хімічні формули знайдених речовин показані на рисунку 2.11.

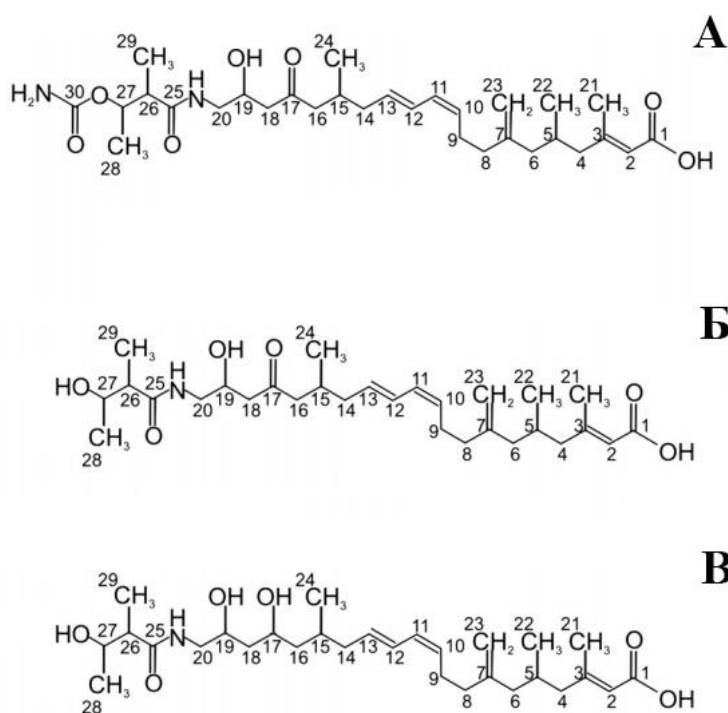


Рис. 2.11. Структурні формули батуміну (А), та його похідних: дескарбамоїл-батуміну (Б) та 17-гідроксibatуміну (В)

Дескарбамоїл-батумін (рис. 2.11-Б) має антистафілококову активність, але вона менша, ніж у батуміну, ця речовина демонструє вузький спектр антибіотичної активності (*E. coli* стійка до цього антибіотика). Ґрунтуючись на дослідженні з нокауту кластера генів батуміну можна відслідкувати походження цієї сполуки:

дескарбамоїл батумін синтезується перед перетворенням карбамоїлтрансферазою, а його активність у вісім разів знижена щодо *S. aureus* [41]. Біосинтез похідних батуміну в немutowаних *P. batumici* може відбуватися як побічний продукт при метаболічному шляху біосинтезу батуміна, коли кількість попередника перевищує реактивну ємність наявної кількості ферменту. Дескарбамоїл батумін синтезується коротшим метаболічним шляхом, уникаючи трансформації карбамоїлтрансферазою і коротколанцюговою дегідрогеназою (рис. 2.12).

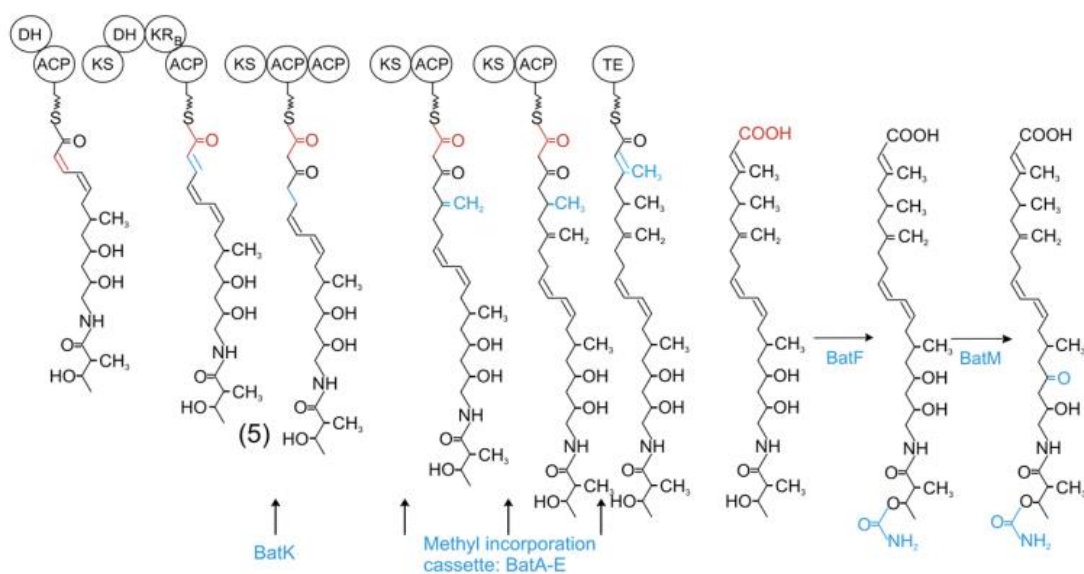


Рис. 2.12. Фінальна стадія біосинтезу батуміну. BatM – карбамоїлтрансфераза, продукт гену BatM, BatF – коротколанцюгова дегідрогеназа, продукт гену BatF [41]

П'ята речовина теж являє собою побічний продукт біосинтезу батуміну і зберігає антистафілококову активність, хоча зона гальмування менша на 12 мм і також не проявляє своєї активності проти *E. coli*. Кето-група C-17 реоксидується коротколанцюговою дегідрогеназою для синтезу цільового продукту – антибіотика батуміну (рис. 2.12). За тих самих обставин, що і дескарбамоїл-батумін, 17-гідроксibatумін може бути виявлений в екстракті немutowаного *P. batumici*.

Результати біоавтографії показують кореляцію між зонами затримки та хімічною структурою антибіотиків. Найбільш активним щодо *S. aureus* є батумін в кето-формі. При дослідженні активних центрів молекули батуміну, які відіграють

ключову роль в активності антибіотику, було показано, що атом кисню C-17 карбонілу молекули батуміну, гідроксильна група C-19, атоми водню карбамату NH₂ зв'язуються з цільовим білком у *S. aureus* під назвою FabI, який є ферментом еноіл-ацильного носія протеїнредуктази, і таке блокування біосинтезу жирних кислот порушує розвиток золотистого стафілококу і, власне, викликає високу антистафілококову активність [42]. Проте всі чотири похідні здатні імітувати зігнуту конформацію природного жирного ацилу завдяки унікальному розподілу sp²- та sp³-гібридизованих вуглеців, хоча їх антистафілококова активність нижча, порівнюючи із батуміном.

Але батумін у кето-формі є єдиним антибіотиком серед виявлених похідних, який здатний проникати в грам-негативні клітини *E. coli* та проявляти помірну антибіотичну активність. У цьому випадку атом кисню C-17 карбонілу молекули батуміну, гідроксильна група C-19, атоми водню карбамату NH₂ можуть відігравати ключову роль у транспортуванні в грам-негативні клітини, і відсутність одного із згаданих активних центрів призведе до повної резистентності *E.coli* до дії сполуки. Для транспортування в клітину грам-негативних бактерій батумін також може імітувати жирну кислоту, але якщо у *S. aureus* батумін та його похідні зв'язуються з білком FabI, то у периплазматичному просторі кишкової палички є ще один білок, з яким зв'язуватись може лише батумін, щоб потрапити в клітину бактерії, що вказує на унікальну властивість цієї молекули та її мультифункціональність.

2.2.6. Ідентифікація виділених клінічних штамів

Гладько та співавтори [43] у своїй роботі відмічають, що три самих поширених роди бактерій, які мешкають на кожному покриві людини наступні: *Corynebacteria*, *Propionibacteria* та *Staphylococcus*. В зонах із активною роботою сальних залоз на обличчі та потилиці (що було особливістю донора клінічних штамів) в свою чергу переважають бактерії родів *Propionibacterium* та *Staphylococcus*.

Забарвлення за Грамом показало (рис. 2.13), що досліджувані штами є грам-

позитивними коками, які утворюють виноградоподібні кластери, що характерні для представників роду *Staphylococcus*.

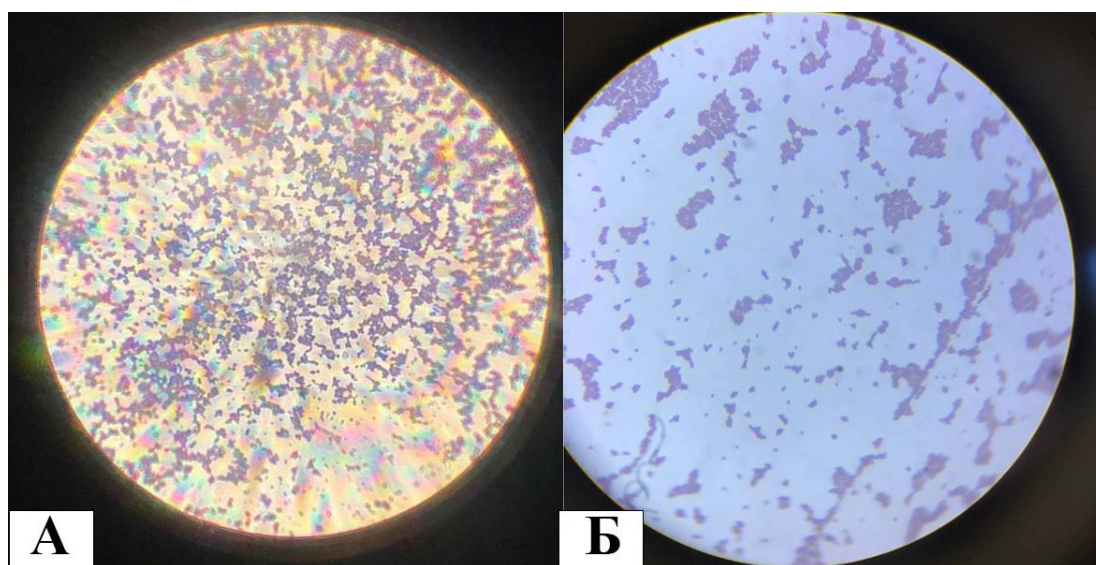


Рис. 2.13. Світлова імерсійна мікроскопія забарвлених за Грамом тест-штамів. А – збільшення в 700 разів, Б – збільшення в 1600 разів

Морфологія виділених штамів майже не відрізняється від колоній *Staphylococcus aureus* В-918, із яким порівнювали виділені штами – вони утворюють округлі, дрібні, непрозорі, гладенькі колонії з рівними краями діаметром 1-2 мм вже через 24 години культивування, проте на скошеному агарі чітко видно різницю у забарвленні колоній (рис.2.14).

Вивчення виділеної чистої культури має на меті, перш за все, диференціювання виду стафілокока з високим патогенним потенціалом (як правило, це *S. aureus*) від сапрофітних видів, які внаслідок їх великої поширеності можуть також бути присутні у досліджуваному матеріалі [44], тому виділені клінічні штами досліджували порівнюючи із золотистим стафілококом.

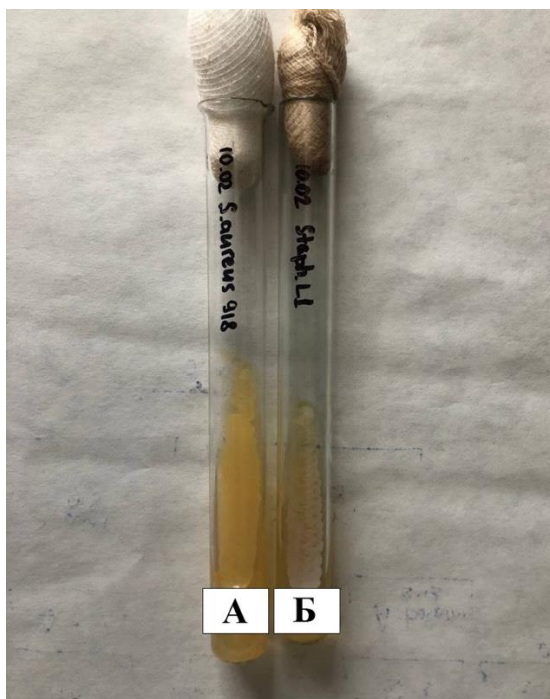


Рис. 2.14. Забарвлення колоній. А – колонії *Staphylococcus aureus* В-918 золотистого кольору, Б – колонії клінічного штаму білого кольору

Клінічні штами були чутливі до діагностичного препарату «Діастаф», який був розроблений для ідентифікації стафілококів (рис. 2.15) серед інших грам-позитивних коків. Зони затримки росту становили 34 мм для клінічного штаму.

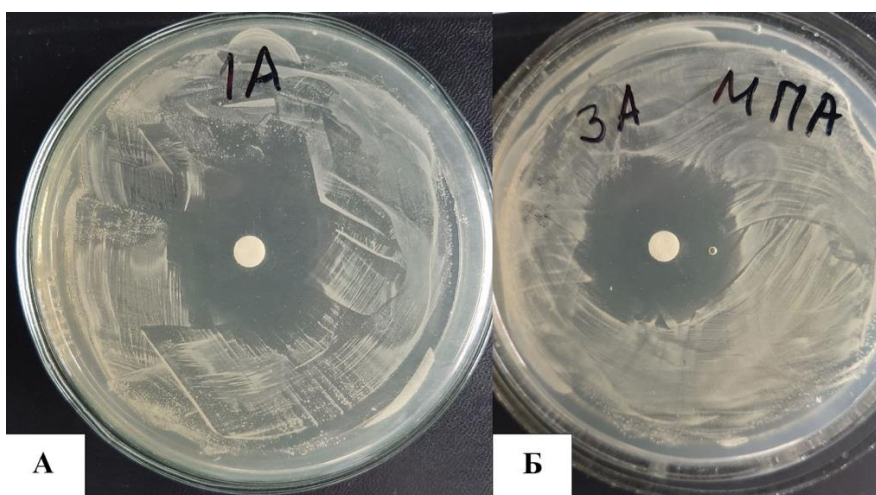


Рис. 2.15. Діагностика клінічних штамів препаратом «Діастаф» - зони затримки росту відповідають розрахованим для бактерій роду *Staphylococcus*

Отримані результати свідчать про те, що виділені штами відносяться до роду *Staphylococcus*, проте не є золотистим стафілококом через біле забарвлення колоній. Види стафілококів, на які препарат “Діастаф” також діє наступні: *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus* (МПК – 0,25 мкг/мл) та *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. sciuri* (МПК – 0,5 мкг/мл) [5].

Для клінічних штамів біло отримано мінімальну пригнічуючу концентрацію антибіотиком батуміном – 0,25 мкг/мл, що дає змогу звужити таксономічний пошук до таких видів: *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*. Для подальшої ідентифікації використали тест-систему для стафілококів, зазначену в п. 2.1.3. матеріалів і методів. Результати реакцій (рис. 2.16) дають змогу охарактеризувати біохімічні властивості клінічних штамів (таблиця 2.4).



Рис. 2.16. Результати реакцій для клінічного штаму

Таблиця 2.4. Біохімічна характеристика досліджуваних штамів

Характеристика	Реакція («+» - позитивна, «-» - негативна)
Споживання D-глюкози	+
Споживання D-фруктози	+
Споживання D-манози	+
Споживання D-мальтози	+
Споживання D-лактози	-
Споживання D-трегалози	-
Споживання D-манітолу	-
Споживання ксилітолу	-

Продовження табл. 2.4

Споживання D-мелібіози	-
Споживання D-рафінози	-
Споживання D-ксилози	-
Споживання D-сахарози	-
Окиснення метил- α D-глюкопіранозиту	-
Окиснення N-ацетил-глюкозаміну	-
Наявність аргиніндігідролази	+
Наявність уреаз	+

Для виділених клінічних штамів було визначено спектр чутливості до антимікробних препаратів. За отриманими результатами штам було віднесено до категорій «чутливий», «частково резистентний» та «резистентний» по відношенню до антимікробного препарату (таблиця 2.5).

За проведеними аналізами виділені клінічні штами можна попередньо ідентифікувати як *Staphylococcus capitis*.

Таблиця 2.5. Спектр чутливості до антимікробних препаратів виділеного клінічного штаму

Антибіотик	Чутливість штаму
Фузидин	чутливий
Тетрациклін	резистентний
Левоміцетин	частково резистентний
Сульфотіазол	резистентний
Амоксицилін	чутливий
Банеоцин (бацитрацин і неоміцин у співвідношенні 1:20 відповідно)	частково резистентний
Мупіроцин	чутливий
Доксоциклін	чутливий

S. capitis був класифікований як вид коагулазонегативних стафілококів (CoNS). Багато видів CoNS, які традиційно вважаються коменсалами, на сьогодні визнані умовно патогенними мікроорганізмами людини. В результаті численних досліджень було виявлено, що CoNS є найчастіше клінічними ізолятами збудників інфекцій крові у відділеннях інтенсивної терапії, особливо цей вид є

проблематичним у відділеннях інтенсивної терапії новонароджених, він спричиняє до 20% випадків неонатального сепсису. *S. capitis* також іноді асоціюється з нативним та протезним ендокардитом клапанів, а також із лікарняним менінгітом. Незважаючи на роль *S. capitis* в цих інфекціях, дуже мало відомо про його патогенність. Крім того, лікування інфекцій, викликаних *S. capitis* ускладнюється появою штамів зі зниженою сприйнятливістю до останніх ліній антистафілококових агентів, включаючи ванкоміцин та лінезолід [45].

Слід зазначити, що для остаточно визначення видової приналежності штамів необхідне проведення секвенсу гену 16S рРНК та аналізу результатів за допомогою бази даних GenBank. Оскільки клінічні штами були ідентифіковані фенотиповими методами і без застосування генетичних досліджень, в даній роботі ці штами наведено без видової приналежності, а саме як *Staphylococcus* spp. L1 та *Staphylococcus* spp. L2.

3. РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЕКТУ

Резюме: розробка технології виробництва нового антистафілококового антибіотику топічного застосування – батуміну. Відомий аналог – мупіроцин, втрачає свою ефективність через поширення антибіотикорезистентності, в той час, як батумін є новим антибіотиком, який ще не використовували в клініці. Через специфіку регіону, комерціалізація можлива лише через продаж штаму-продуценту і патенту іноземним фармацевтичним компаніям, а не створення власного виробництва. Вартість розробки ідеї розрахована із включенням попередніх наукових досліджень з часу незалежності України і необхідних додаткових досліджень на наступні 5 років – 18 030 345,4 грн. При цьому, запропонована ціна продажу інтелектуальної власності 4 894 645 000 грн. становить лише 50% від ринкової ціни вартості іноземних розробок нових антибіотиків, що також надає конкурентну перевагу стартапу. Із розрахованої ціни, період повернення капіталовкладень становить 1,6 діб.

Таблиця 3.1 – Резюме стартап-проекту

Показник	Характеристика
1. Сутність ідеї	Розробка технології виробництва антибіотику батуміну у вигляді АФІ (патент) і продаж промислового штаму-продуцента
2. Наявність аналогів і прототипів ідеї	Антибіотик-аналог – мупіроцин
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Антистафілококова терапія, топічне застосування
4. Ступінь розробленості технології реалізації	80%
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	Інтелектуальна власність класифікується як послуга Клас 44
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	Клас 72.11 Дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій
7. Очікувана потужність стартапу	Мале підприємство
8. За масштабом виробництва	Одиничне
9. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
10. За ресурсами, що споживатимуться	Працемістке, інформаційномістке

Продовження табл. 3.1

11. За чисельністю персоналу	Мале
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні
13. Бажане географічне розташування - потужностей стартапу; - офісу стартапу; - збутової мережі; - постачальників комплектуючих	- вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143; - вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143; - вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143; - ЄС, Україна
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	Розробка
15. Гранична корисність ідеї стартапу	Попередження мультирезистентних стафілококових інфекцій у пацієнтів шпиталів
16. Бізнес-модель стартапу	B2B
17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	немає
18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Мупіроцин В стадії реалізації з 1985 року, технологія має більш продуктивний штам
19. Ключові фактори успіху стартапу	Новизна антибіотику (ще немає резистентних до нього стафілококів)
20. Споживачі (основні на етапі впровадження, групи, орієнтовна чисельність)	Великі фармацевтичні іноземні компанії, одна із 10 вказаних в п. 3.1.
21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації	1 патентне посвідчення
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості	1 патентне посвідчення
23. Споживачі на етапі розвитку	-
24. Споживачі на етапі зрілості	Фармацевтичні іноземні компанії
25. Конкурентна ціна на продукт стартапу	4 894 645 000 грн.
26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	21 861%
27. Капіталовкладення в проект	18 030 345,4 грн.
28. Період повернення капіталовкладень у проект	1,6 діб
29. Джерела фінансування	Державний бюджет
30. Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Інтелектуальна власність (ІВ) і штам-продуцент (доля 50% і 50% відповідно, ступінь готовності 90% ІВ і 50% штам)

Продовження таблиці 3.1

31. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних, плановий обсяг замовлень, наявна потужність постачальника)	Реактиви – закордонні та вітчизняні постачальники, обсяг визначається виділеним бюджетом НАН України – 10 тис. грн. на рік
32. Планове місце реалізації результату розробки (місце, планова доля реалізації продукту через це місце)	Великобританія (GSK), 1
33. Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)	Ні
34. Методи просування результатів розробки на ринок	Особистий продаж

3.1. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища

	Загрози	Можливості
Економіка		
1. Створено лояльні умови для розвитку малого бізнесу, прозорі умови для ФОПів	- при доході в 0 гривень слід буде платити ЄСВ за кожного працівника (1320 гривень в місяць) – потенційні втрати коштів	+ для малих підприємств (ФОПів) податок на дохід становить лише 5% - мале податкове навантаження
2. Очікувана криза по фоні пандемії COVID-19	- більш обережна поведінка потенційних інвесторів – складніше отримати інвестиції в стартап	+ для інвесторів проекти медичної направленості можуть бути більш привабливими
3. Стабілізація курсу валют	- валютні капіталовкладення в проект не будуть рости в гривні	+ відкриває можливості спокійно робити закупки сировини та матеріалів за кордоном
Політика		
1. Позитивна національна політика для інноваційних наукових проектів	- зростаюча конкуренція серед науковців – складніше отримати фінансування	+ можливість виграти державний грант і отримати фінансування на декілька років

Продовження табл. 3.2

2. Стимулююча політика у сфері науки щодо молодих науковців (до 35 років)	- неможливість включити у такі проекти кваліфікованих працівників старше 35 років	+ звужує конкуренцію серед науковців за віковим параметром, підвищує шанси отримати фінансування для молодих спеціалістів
3. Поступове слідування принципам демократичності і боротьба із корупцією	- уряду не вдається ефективно боротися із корупцією, внаслідок чого інвестиційна привабливість країни падає	+ слідування демократичним позитивно впливає на імідж країни і її науковців, відкриває можливості для міжнародного співробітництва і отримання міжнародних грантів
Географія		
1. Наявність сировини	- собівартість виготовлення товару в Україні буде відносно високою, якщо порівнювати з аналогічними виробництвами в Китаї тощо	+ матеріали для проекту наявні в Україні, їх не треба імпортувати
2. Розташування України	- частина великих гравців фармацевтичного ринку розташована в США, досить далеко від України	+ Географічне розташування виробника (Україна) дає змогу легко експортувати продукцію в Європу, де наявні великі фармацевтичні компанії
3. Логістика	- на даний час небезпечно транспортувати товар через Білорусь, тому ціна автотранспортування зростає, через вищу ціну пропуску на автобани Польщі та інших європейських країн	+ можливість використовувати найдешевший вид транспортування - водний транспорт, через наявні виходи в море
Науково-технічний прогрес		
1. Пошук аналогів антибіотикам	- зменшує ступінь інноваційності розробки і її привабливості для інвесторів	+ на даний час немає розробок, які могли б конкурувати із антибіотиками у лікуванні інфекційних хвороб
2. Розвиток ринку вакцин	- вакцини проти стафілококів є потенційними конкурентами за інвестиції	+ вакцини не лікують, а лише попереджують хворобу або зменшують тяжкість перебігу хвороби – все одно необхідно розробляти ліки

Продовження табл. 3.2

3. Зростаюча антибіотикорезистентність	- з точки зору довготривалого інвестування антибіотики є не вигідними, адже проти будь-якого антибіотику із часом з'являються резистентні бактерії	+ задає попит на нові антибіотики, через те, що старі вже гірше діють
Демографія		
1. Співвідношення працездатного населення до людей пенсійного віку	- на даний час співвідношення 1:1 в купі із соціальною політикою держави веде до податкового тиску на населення, спеціалісти більше зосереджені на виживанні, ніж на ефективній роботі у своїй сфері	+ можливість найняти працюючого пенсіонера із великим досвідом в науковій сфері
2. Міграція працездатного населення за кордон	- зменшення кількості кваліфікованих кадрів в країні	+ при підтримці зв'язків із колегами можливе міжнародне співробітництво
3. Зростаюче населення світу	- більше людей – більше науковців – вища конкуренція, в тому числі, у сфері розробки антибіотиків	+ збільшення густини населення веде до більш швидкого поширення інфекцій і, як наслідок, більше хворих, що потребують антибіотикотерапії
Соціо-культурна сфера		
1. Низька обізнаність у проблемах антибіотикорезистентності та її поширення	- неконтрольоване споживання антибіотиків призводить до швидкого зниження ефективності препарату та його вилучення з ринку	+ антибіотичні мазі також використовують для боротьби із висипанням на обличчі, додаткові потенційні споживачі продукту
2. Нерозв'язана дилема антибіотиків – з одного боку вони є необхідністю, з іншої – вони програють як товар в умовах ринкової економіки	- мало хто із спеціалістів хоче займатися антибіотиками – це не вигідно з точки зору довготривалої перспективи	+ фармацевтичні гіганти все одно інвестують в розробку нових антибіотиків, маючи на увазі не вигоду, а соціальну відповідальність
3. Вплив пандемії на свідомість людей	- зростаюча популярність вакцин може вплинути на те, що це буде новий шлях боротьби із бактеріальними інфекціями, таким чином розв'язуючи проблему антибіотикорезистентності	+ на фоні масштабу пандемії проблема вторинних бактеріальних інфекцій загострилась і тема розробки нових антибіотиків знову почала циркулювати в суспільстві

До факторів зовнішнього оперативного середовища відносять конкурентів, постачальників, посередників, споживачів. Стартап розробляється як інтелектуальна власність із тестовою партією антибіотика для проведення клінічних випробувань. Посередники не включені в ланцюжок (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Конкуренти 1. Бельгійські вчені із штабом-продуцентом батуміну 2. Інші вчені, що займаються розробкою антибіотиків	+ близькість до європейських фармацевтичних компаній; + близькість фармацевтичних компаній-гігантів, більше можливостей проводити якісні дослідження, краще фінансування.	- за спеціалізацією є переважно хіміками, проте даний антибіотик дуже складно синтезувати хімічно через його структуру; - більшість інших антибіотиків мають широкий спектр дії, тоді як батумін є вузькоспецифічним антистафілококовим антибіотиком (в умовах боротьби із антибіотикорезистентністю перевагу мають антибіотики вузького спектру дії).
Постачальники 1. Вітчизняні 2. Китайські 3. Європейські	+ швидко, легше контролювати, у разі невідповідності сировини легше і дешевше почати судову тяжбу; + дешево; + стабільно висока якість кожної партії.	- не найдешевша продукція, якість може варіюватися від партії до партії; - дуже довго, у випадку невиконання умов договору надзвичайно складно притягнути до відповідальності; - дорого.

Продовження табл. 3.3

Споживачі (фармацевтичні компанії)		
1. Johnson & Johnson, США, мультинаціональна корпорація	+ лідер фармацевтичного ринку за капіталізацією – мають кошти для інвестицій; + багато інвестують для боротьби із антибіотикорезистентністю;	- можуть мати власні більш перспективні розробки.
2. Pfizer, США, мультинаціональна корпорація	+ проводять власні дослідження і розробку антибіотиків [46] – можуть бути зацікавлені у розширенні пулу розробок.	
3. Roche, Швейцарія	+ активно інвестують у розробку антибіотиків [47].	- можуть направити кошти на розробку антибіотиків у вигляді пігулок, а не мазі.
4. Novartis, Швейцарія	+ на фоні пандемії коронавірусу переглянули свою політику щодо інвестування в протимікробні препарати [48].	- неохоче інвестують в «старі» класичні антибіотики, радше виберуть проект, який розробляє принципально новий підхід боротьби із інфекціями.
5. Merck & Co., США, мультинаціональна корпорація	+ підрозділ дженериків та біоподібних препаратів Novartis, разом із федеральним урядом Австрії інвестують у виробництво антибіотиків у Європі [49].	- можуть направити кошти на розробку антибіотиків у вигляді пігулок, а не мазі.
6. GlaxoSmithKline, Великобританія, мультинаціональна корпорація	+ багато інвестують для боротьби із антибіотикорезистентністю.	- інвестують в проекти, які розробляють принципально нові підходи боротьби із інфекціями [50].
7. GlaxoSmithKline, Великобританія, мультинаціональна корпорація	+ проводять власні дослідження і розробку антибіотиків [46] – можуть бути зацікавлені у розширенні пулу розробок;	- можуть мати власні більш перспективні розробки.
8. GlaxoSmithKline, Великобританія, мультинаціональна корпорація	+ випускають мупіроцин – подібний за своєю дією антибіотик у вигляді мазі, що полегшує імплементацію технології стартапу на готовій виробничій базі.	

Продовження табл. 3.3

7. Sanofi, Франція, мультинаціональна корпорація	+ інвестують в боротьбу із антибіотикорезистентністю.	- Санофі оголосили у 2018 році, що вони відмовляються від свого підрозділу з досліджень та розробки протиінфекційних препаратів [51].
8. AbbVie, США	+ виготовляють антибіотики (еритроміцин, циклоспорин) у вигляді АФІ на замовлення [52].	- можуть бути не зацікавлені у виробництві мазі; - малоймовірно інвестують у даний стартап.
9. Takeda, Японія, мультинаціональна корпорація	+ разом із іншими японськими фармацевтичними компаніями займаються пошуком нових антибіотиків [53].	- можуть мати власні більш перспективні розробки. - можуть направити кошти на розробку антибіотиків у вигляді пігулок, а не мазі.
10. Shanghai Pharmaceuticals Holding, Китай	+ в 2019 викупили права та виробничі потужності на 2 антибіотика в американських виробників [54]	- лише розробленої технології без виробничих потужностей може бути недостатньо для продажу стартапу.

За результатами аналізу факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ сформовано перелік зацікавлених сторін у таблиці 3.4 для визначення потенційних загроз у процесі впровадження розробки, при формуванні ризиків стартап-проекту (інноваційної розробки).

Таблиця 3.4 – Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища			
Виробник (конкуренти)	Бельгійські вчені можуть продати розробку батуміну раніше	Не зацікавлені в успіху цього проекту взагалі, є прямими конкурентами	0,35
Постачальник	Від постачання сировини та матеріалів для виготовлення продукції залежить виробництво тестової партії	Зацікавленість, як до потенційного споживача сировини та матеріалів	0,05

Продовження табл. 3.4

Споживачі	Від фармацевтичних компаній залежить окупність проекту	Зацікавлені поповнити портфель розробок, які згодом можна буде випустити на ринок замість старих антибіотиків	0,25
Зовнішнє середовище			
Політичні структури	Впливають на Національну академію наук, можуть урізати фінансування установи, чи розширити його	У разі успіху це буде гучний інфопривід для піару політиків та різноманітних спекуляцій для підвищення рейтингу серед електорату	0,05
Суб'єкти економічного середовища	При продажі проекту іноземній компанії можна буде покрити дефіцит бюджету в Інституті мікробіології та вірусології НАН України	Мало зацікавлені	0,05
Власники географічних об'єктів	Держава є власником будівель Інституту мікробіології та вірусології, на базі яких буде створено стартап. На прикладі Інституту фізіології – держава може прийняти рішення про передачу будівлі іншому суб'єкту господарювання й урізати чи унеможливити проведення наукової роботи	Мало зацікавлені	0,05
Суб'єкти демографії	Є реципієнтами нових ліків, які можуть зберегти життя або покращити його якість	Зацікавленні у разі інфекційної хвороби	0,1
Суб'єкти культурного середовища	Антибіотики не найбільш приваблива тема як для пересічної людини, так і для професійного кола, через «дилему антибіотиків»	Мало зацікавлені	0,05
Суб'єкти НТП	Можуть бути партнерами при розробці стартапу	Мало зацікавлені	0,05

У таблиці 3.5 представлений аналіз внутрішнього середовища підприємства, що забезпечує визначення сильних та слабких сторін в процесі реалізації стартап-проекту.

Таблиця 3.5 – Переваги і недоліки внутрішнього середовища

	Переваги	Недоліки
Організаційна структура	+ добре структурований розподіл праці; + висококваліфіковані кадри.	- громіздка бюрократія; - найкраще кваліфіковані кадри мають найвище навантаження; - немає «бази знань» - ключові знання переходять у якості фольклору, а не систематизованої бази напрацювань у вигляді архіву записів чи електронної бази, внаслідок чого вони втрачаються разом із працівником; - немає чітко прописаного пулу обов'язків для кожної позиції, можливі ситуації в яких ніхто не відповідає за певний шматок роботи; - немає добре злагодженого контролюючого механізму, можливі ситуації в яких якість роботи співробітника ніхто не контролює; - механізм просування по верхнім кар'єрним позиціям є морально застарілою радянською спадщиною, де беруться до уваги не реальні показники якості роботи, а номінальні, такі як стаж і звання.
Соціальна структура	+ низька конфліктність; + немає жорсткої конкуренції; + є певна ієрархія.	- немає чітко налагодженої комунікації; - відтік молодих і перспективних кадрів; - немає чітко прописаної політики щодо кадрів (наприклад, політики протидії небажаним поведінці, харасменту тощо).
Виробничо-технічна система	+ наявність ефективної системи контролю якості; + висока якість вихідної продукції.	- частина матеріальної бази є застарілою; - слабка ремонтна база.

Продовження табл. 3.5

Маркетингова система	+ ефективний аналіз ринку; + детально розроблена маркетингова стратегія.	- на початкових етапах складно конкурувати із іноземними науковцями.
Науково-інноваційна система	+ наявність кваліфікованого персоналу для розробки продукту.	- може виникнути нестача матеріальної бази.

За результатами аналізу середовищ було сконкретизовано об'єкт стартап-проекту – технологія виробництва 2% батумінової мазі – інтелектуальна власність на продаж і виробництво тестової партії мазі на базі Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України та її продаж для проведення клінічних досліджень препарату.

3.2. Визначення ключових факторів успіху проекту

На підставі аналізу факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ ключові фактори успіху ідеї та технології такі: ефективність препарату, простота технології (наприклад, хімічний синтез буде мати перевагу над біотехнологічним через простоту) та продуктивність промислового штаму. Відомо, що мупіроцин (конкурент) виробляється шляхом ферментації м/о *Pseudomonas fluorescens*, батумін отримується також біотехнологічним шляхом із *Pseudomonas batumici*, тому до уваги беруться умови біосинтезу. Ферментація штамів *Pseudomonas fluorescens* проводиться протягом 50 годин для отримання максимального виходу мупіроцину (980 мг/л для штаму *Pseudomonas fluorescens* Z4) [55], у той час, як для *Pseudomonas batumici* В-321 потрібно 55 годин для отримання концентрації 175-180 мг/л [29]. Для біосинтезу мупіроцину в поживне середовище включають різноманітні рослинні олії, гліцерин та кукурудзяний сироп [55], в той час, як для біосинтезу батуміну поживне середовище пропонується простого і більш дешевого складу [56].

Таблиця 3.6 –Оцінка характеристики за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Оцінка характеристик	
		Наша продукція (батумін)	Конкурент (мупіроцин)
Простота технології	0,25	5	3
Продуктивність промислового штаму	0,35	1	5
Ефективність препарату	0,4	5	2

З урахуванням коефіцієнту вагомості характеристики визначається бальна оцінка кожної характеристики для нашої продукції і для конкурентів:

Характеристика	Бальна оцінка характеристик	
	Наша продукція (батумін)	Конкурент (мупіроцин)
Простота технології	1,25	0,75
Продуктивність промислового штаму	0,35	1,75
Ефективність препарату	2,0	0,8

На підставі отриманих бальних оцінок побудовано графік порівняння конкурентних переваг нового антибіотика батуміну і мупіроцину (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Порівняння конкурентних переваг інноваційної ідеї з конкурентом

На основі аналізу ключових факторів успіху стартап-проекту сформовано

можливі варіанти розвитку інноваційної ідеї та визначено основну стратегію доопрацювання (табл. 3.7).

Таблиця 3.7 – Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
Продаж ідеї на даному етапі наукових досліджень	Потенційні споживачі (фармацевтичні компанії) можуть не зацікавитися через низьку продуктивність штаму, крім того штаму не захищений від крадіжки
Продаж ідеї після доопрацювання	Інноваційна ідея буде мати більшу привабливість для потенційного споживача. План доопрацювання: 1. Підвищення продуктивності штаму. Для цього необхідне більш детальне вивчення шляху біосинтезу, репресії біосинтетичного шляху для зняття природних обмежень штаму. 2. Надання штаму ауксотрофності за «таємним» інгредієнтом для захисту інтелектуальної власності і промислового штаму. 3. Отримання прав на ноу-хау (захист інтелектуальної власності таким способом дозволяє не розкривати «таємний» інгредієнт). За цим сценарієм необхідний додатковий час і кошти, проте ефективність мупіроцину (конкурента) за цей час буде невпинно падати через поширення антибіотикорезистентності.

3.3. Визначення потенційних споживачів

Через специфічність інноваційної розробки, варіант B2C не розглядається взагалі, через те, що в середньому окупність антибіотиків становить 23-25 років [11], по-друге в Україні немає промислових потужностей для виробництва активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) біотехнологічним шляхом. Єдиний перспективний шлях в наявних умовах – це продаж ідеї і технології виробництва у вигляді інтелектуальної власності великим фармацевтичним іноземним компаніям.

Таблиця 3.8 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
1. Юридична особа	
1. Форма власності (державне, приватне, колективне, комунальне, змішане,...)	приватне
2. КВЕД	Клас 21.20 Виробництво фармацевтичних препаратів і матеріалів

Продовження табл. 3.8

3. За потужністю (малі, середні, великі)	великі
4. За масштабом виробництва (одиничні, серійні, масові)	масові
5. За рівнем спеціалізації (вузькопрофільні, багатoproфільні, комбіновані)	вузькопрофільні, комбіновані, багатoproфільні
6. За ресурсами, що споживаються (працемістки, матеріаломістки, інформація)	працемістки, капіталомістки
7. За чисельністю персоналу (малі, середні, великі)	великі
8. За сферою діяльності (виробничі, комерційні, фінансові, посередницькі, страхові...)	виробничі
9. За приналежністю капіталу і контролю (національні, іноземні, спільні багатонаціональні,...)	іноземні
10. За географічним розташуванням	за кордоном
11. За віддаленістю органів управління (національні, міжнародні, офшорні, транснаціональні,...)	міжнародні, транснаціональні
12. За характером господарської діяльності (промислові, сільськогосподарські, транспортні, будівельні, фінансово-кредитні, страхові, туристичні, консалтингові,...)	промислові
13. За рівнем технологічної цілісності (провідні, дочірні, філії,...)	провідні, дочірні
14. За долею іноземного капіталу (з іноземними інвестиціями (більше 10%), іноземне підприємство (100%)).	іноземне підприємство (100%)
15. За формуванням статутного капіталу (унітарні, корпоративні)	корпоративні
16. За організацією виробничих процесів (періодичні, безперервні)	періодичні, безперервні
17. За роботою протягом року (сезонні, позасезонні)	позасезонні
18. За географічним розташуванням на території України	не наявні
19. За наявністю вільних ОБЗ (коштів)	наявні у великій кількості
20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи: – Регіон – Чисельність населення – Динаміка росту регіону – Структура регіону – Правові обмеження торгівлі	- Європа/США/Японія; - від 100 млн.; - позитивний приріст; - федеративний поділ; - сильна регуляція фармацевтичних продуктів (GMP), обмеження використання антибіотиків на запобігання поширення антибіотикорезистентності

На підставі отриманих результатів сформовані вимоги до кінцевого продукту у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія (група) клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
1. Великі іноземні фармацевтичні компанії	Розширення пулу фармацевтичних розробок, майбутній продаж препарату-аналогу мупіроцину
Відкоригована ідея стартап проекту	
Технологія отримання антибіотика батуміну – інтелектуальна власність на продаж, передача промислового штаму-продуцента антибіотика. З огляду на складність дотримання вимог GMP для виробництва мазі і жорстку регуляцію виробництва фармацевтичних продуктів, прийнято рішення розробляти науково-технічні засади отримання АФІ, а не готової мазі.	

Паспорт потенційного клієнта наведено в таблиці 3.10.

Таблиця 3.10 – Паспорт потенційного клієнта

Характеристика	Значення	Примітка
Організаційно-правова форма	Приватне підприємство	
Класифікація -за потужністю -за чисельністю персоналу -за обсягом виробництва -за сезонністю виробництва -інше	-велике; -велике; -масове, серійне; -позасезонне.	частина препаратів виробляється масово, через великий попит (наприклад, анальгетики), у той час, як мупіроцин (аналог батуміну) виробляється серійно
Розташування -місто -сміт -село -інше	місто	
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	інтелектуальна власність і штамп-продуцент	
Призначення придбаної розробки -за призначенням -інше	за призначенням	

Продовження табл. 3.10

Кваліфікація персоналу підприємства -робочі -службовці -керівники	робочі, керівники	
Потенційний обсяг споживання розробки -одиниця -1-5 -інше	одиниця	
Хто приймає рішення про придбання розробки (узагальнена характеристика працівника)	рада директорів корпорації	особи, що приймають рішення про придбання інтелектуальної власності

Плановий обсяг реалізації стартап-проекту за місяцями (кількість проданих ліцензій при реалізації методики) наведено в таблиці 3.11. Для доопрацювання стартапу відводиться 1 цикл (5 років) запланованих робіт на базі Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, після чого, готова інтелектуальна власність пропонується на продаж. Перші 10 років виробник має ексклюзивні права на дану розробку [57] – це збільшений показник для заохочування виробників займатися антибіотиками. Після цього, конкуренти мають право виробляти дженерики і повторний продаж розробки малоімовірний.

Таблиця 3.11 – Запланований обсяг реалізації стартап-продукту

	Червень , грудень 2026
Запланований обсяг	1

3.4. Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Ціна розробки антибіотика батуміну у вигляді АФІ буде формуватися конкурентним методом, знаючи приблизну ціну доклінічних розробок антибіотиків у світі (рис.3.2). Із графіка можна побачити, що максимальна ціна розробки антибіотика становить 350 млн. доларів США. Для швидкого продажу і привабливості ціни для споживача, ціну можна знизити, проте вона не повинна

бути меншою за собівартість. При розрахунку собівартості виникають труднощі, через довгу історію вивчення батуміну – він бере свій початок ще за радянських часів, тому собівартість можна встановити лише приблизно і за часів незалежності України.

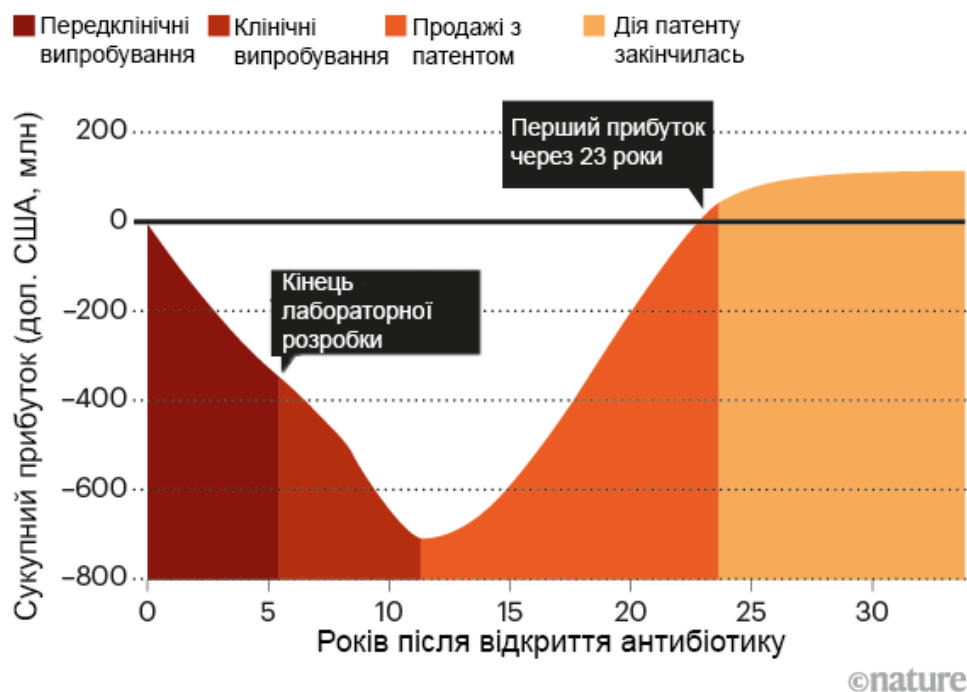


Рис. 3.2. Середня динаміка сукупного прибутку при розробці антибіотику [11]

Слід зазначити, що незалежно від кінцевого призначення АФІ (мазь чи пігулки), ціна доклінічних досліджень буде для всіх антибіотиків буде приблизно така, як вказано на графіку. Для розрахунку в гривні взято офіційний курс НБУ станом на 30.03.2021 – 27,9694 гривень за 1 долар США. Попередня ціна продажу розробки наведена в таблиці 3.12 і становить половину ринкової ціни розробки нового антибіотику.

Таблиця 3.12 – Проектні ціни продажу інноваційної розробки

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
	Кількість, од.	Ціна, грн/од.	Кількість, од.	Ціна, грн/од.
Розробка отримання протистафілококового антибіотику у вигляді АФІ	1	4 894 645 000	невідомо	9 789 290 000

При аналізі точки беззбитковості береться за основу підрахунок собівартості розробки. Енергоспоживання Інституту мікробіології та вірусології становить 450-500 тис. кВт на рік. Бюджет відділу антибіотиків - 1.5-2 млн грн./рік, з яких приблизно 10 тис. грн. виділяється на реактиви, а все інше – зарплатний фонд. Так як, Інститут має 15 відділів, а сам відділ антибіотиків має принаймні 4 напрями роботи (вивчення бактерій роду *Bacillus*, еколого-таксономічні дослідження бактерій родів *Pseudomonas*, розробка фітопрепаратів і, власне, дослідження батуміну), загальне енергоспоживання та бюджет ділиться відповідно. Розрахунок точки беззбитковості не впливатиме на об'єм робіт, принцип розробки «все або нічого» - даний стартап або буде продано і досягнуто прибутку, або ні. Мета аналізу беззбитковості – визначити мінімальну ціну інтелектуальної власності. Підрахована собівартість проекту наведена в таблиці 3.14.

Таблиця 3.14 – Калькуляція собівартості розробки

№ п/п	Етап розробки / елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник
1	Етап розробки ідеї -реактиви, амортизація -заробітна плата і нарахування -електроенергія	бюджет за попередні дослідження (30 років) 2 500 грн./рік на розробку батуміна 475 000 грн./рік на розробку батуміна 250 000 кВт	75 000 грн. 14 250 000 грн. 420 000 грн.
2	Етап ринкового дослідження -заробітна плата і нарахування -електроенергія	¼ мінімальної ставки, 1 місяць 53 кВт	1 207,5 грн. 89,04 грн.
3	Етап дослідного випробування -реактиви, амортизація -заробітна плата і нарахування -електроенергія	бюджет на 1 цикл (5 років) 10 тис./рік на 4 напрямки відділу 1,9 млн/рік на 4 напрямки 41 667 кВт	12 500 грн. 2 375 000 грн. 70 001 грн.

Продовження табл. 3.14

4	Етап перемовин із іноземними компаніями (витрати на відрядження) -переліт -розміщення на 1 тиждень -витрати на харчування -добові -візи	3 людини, відрядження в США, Японію, Великобританію, бронювання за 3 місяці	194 951 грн. 138 697 грн. 131 827,5 грн. 131 827,5 грн. 28 507,44 грн.
5	Продаж стартапу -витрати на фахівців із трансферу технологій та юристів -перекладачі -відрядження для підпису контракту і передачі промислового штаму	3 місяці 2 людини в Інституті, 2 з аутсорсу аутсорс, від 70 грн. за 1800 знаків, нотаріальне засвідчення 130 грн. закладено найдорожчий сценарій	60 000 грн. 4 698 грн. 136 039,44 грн.
Всього:			18 030 345,4 грн.

Визначені вартісні показники основних і оборотних засобів проекту наведено в таблицях 3.16, 3.17. Забезпеченість проекту трудовими ресурсами наведено в таблиці 3.18.

Таблиця 3.16 – Забезпеченість проекту основними засобами

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
Розробка ідей, ринкове дослідження, перемовини і продаж стартапу	Комп'ютер	15 000 грн.	10 років	Rozetka	Державний бюджет
	Принтер	10 000 грн.	10 років	HP	Державний бюджет

Продовження табл. 3.16

Розробка ідеї, дослідне випробовування	Хроматограф Agilent 1200 із мас-спектрометром Agilent G1956B Спектрофотометр DeNovix DS-11 FX +	948 516,3 грн.	20 років	Agilent	Державний бюджет
		574 755,58 грн.	15 років		Рада молодих вчених виграла в конкурсі
	Електрофорез	5 331,61 грн.	20 років	Sigma	Державний бюджет
	Лабораторний посуд	48 000 грн.	20 років	Укрналітика	Державний бюджет

Таблиця 3.17 – Забезпеченість проекту оборотними фондами

Група ОбФ	Назва	Норма витрат на рік	Ціна, грн/од	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Сировина і матеріали	Реактиви	В рамках бюджету	10 000 грн.	Sigma-Aldrich	Державний бюджет
Паливо, електроенергія	Електроенергія	250 000 кВт	1,68	ТОВ Київська енергетична компанія	Державний бюджет

Таблиця 3.18 – Забезпеченість проекту трудовими ресурсами

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Кваліфікаційні вимоги	Плановий рівень заробітної плати	Джерело фінансування
Робочі основні	Спеціаліст із трансферу технологій	2	Досвід роботи від 2 років, вдалі кейси трансферу технологій за кордон, знання англійської на рівні fluent	12 500 грн.	Державний бюджет

Продовження табл. 3.18

Робочі допоміжні	Юрист	2	Вища освіта, досвід роботи від 3 років у сфері міжнародного права та патентного права, знання англійської на рівні fluent	Проектна платня або почасова 560 грн./година	Державний бюджет
	Перекладач	1	Знання іноземних мов, досвід роботи від 1 року	Проектна платня, 4 698 грн.	Державний бюджет
Спеціалісти	Старший науковий співробітник	2	Науковий ступінь кандидата наук, стаж від 3 років, знання англійської на рівні fluent	13 500 грн.	Державний бюджет
Молодший персонал обслуговування	Інженер другої категорії	1	Профільна освіта	4 830 грн.	Державний бюджет
Керівники	Завідуючий відділом	1	Науковий ступінь кандидата наук, стаж від 5 років, знання англійської на рівні fluent	18 000 грн.	Державний бюджет

Перед оцінкою прибутку слід зазначити, що продаж патенту оподатковується. Згідно з п. 1.4 Закону про ПДВ передача права на патент є постачанням послуг. А поставка послуг в силу п. 3.1.1 Закону є об'єктом оподаткування ПДВ.

Якщо ж право на патент передається нерезиденту, то на цьому можна заощадити за рахунок більш низької ставки в країні нерезидента. Адже під дію Закону про ПДВ потрапляють операції з поставки послуг тільки на митній території України.

А згідно з п. 6.5 Закону місцем поставки патенту вважається місце державної реєстрації покупця. Отже, передача права на патент буде обкладатися ПДВ не в Україні, а в країні нерезидента.

Що стосується податку на прибуток, то в п. 1.2 Закону "Про оподаткування прибутку підприємств" сказано, що об'єкти ІВ є нематеріальними активами. А згідно з п. 5.3.2 Закону суми, витрачені на покупку нематеріальних активів, що підлягають амортизації, що не відносяться до валових витрат.

Амортизації підлягають ті нематеріальні активи, які купуються для виробничого використання (п. 8.1.2 Закону). Якщо ж нематеріальні активи купуються з метою перепродажу, то витрати на їх покупку не амортизуються і повністю відносяться на валові витрати (п. 8.1.3 Закону).

При визначенні ціни оподаткування інтелектуальної власності буде діяти п. 1.20.6 Закону, який говорить про те, що якщо на ринку немає ідентичних або схожих товарів, то звичайною вважається ціна договору [58].

ПДВ в Україні становить 20%, так само як в Великобританії [59], тоді як в Японії 10% [60], в США (Нью-Йорк 4% - в штаті, а не в місті, що може бути застосовано для головного офісу Johnson&Johnson) [61]. Для розрахунку беремо найбільшу ймовірну ставку – у разі продажу патенту в Великобританію – 20%. Тоді 20% від ціни стартапу дорівнюватиме 978 929 000 грн. Прибуток після сплати податку – 3 915 716 000 грн.

Оцінка стартапу за техніко-економічними показниками наведена в таблиці 3.19.

Таблиця 3.19 – Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Умовне позначення, формула розрахунку
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	Од.	$B = 1$
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Осіб	$Ч_{сп} = Ч_{яв} \times K_{пер}$ 4 5
3. У тому числі - основних; - допоміжних; - інженерно-технічного персоналу	Осіб	5 3 1

Продовження табл. 3.19

4. Середньорічний виробіток робітника (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Од./особу	$ПП_{с.р.} = B/Ч_{сп}$ 0,25 0,2
5. Капіталовкладення у проект (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту): - всього; - на одиницю продукції	Грн. Грн./од.	$K = OF + OBK$ Розробка 17 829 608 грн. Реалізація 200 737,44 грн.
6. Повна собівартість (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту): - всього; - на одиницю продукції	Грн. Грн./од.	$C = A + OBK$ $C_{роз}$ 17 829 608 грн. $C_{реал}$ 200 737,44 грн.
7. Відносний прибуток (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Грн./од.	$\Pi = Ц - C$ $\Pi_{роз}$ 3 897 886 392 грн. $\Pi_{реал}$ 3 915 515 262,56 грн.
8. Рентабельність (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	%	$R = (\Pi/C) \times 100$ $R_{роз}$ 21 861% $R_{реал}$ 1 950 565%
9. Період повернення капіталовкладень (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Років	$T_{пов} = K/\Pi$ $T_{роз}$ 0,0045 $T_{реал}$ 0,00005
10. Фондовіддача виробничих фондів (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Грн./грн..	$\Phi B = (Ц \times V)/OF$ $\Phi B_{роз}$ 4661 грн./грн. $\Phi B_{реал}$ (лише організаційні трати)
11. Фондоємкість (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Грн./грн..	$\Phi E = 1/\Phi B$ $\Phi E_{роз}$ 0,0002
12. Продуктивність праці (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Грн./особу	$ПП = B/(Ч_{сп} \times T)$ $ПП_{роз}$ 222,2 грн./особу $ПП_{реал}$ 4000 грн./особу
13. Коефіцієнт економічної ефективності (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)		$E = \Pi/K$ $E_{роз}$ 218,62 $E_{реал}$ 19 505,66

3.5. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту

Карта бізнес-процесів стартап-проекту наведена в таблиці 3.20. Слід зазначити, що в неї входить етап наукового доопрацювання вже існуючих даних, проте не включено попередні 30 років досліджень, що були включені в собівартість

проекту, з огляду на те, що, по-перше, вже вкладені кошти із державного бюджету не потребують повернення, по-друге, під час цих досліджень не стояла мета реалізації стартапу.

Таблиця 3.20 – Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат (грн.)
Розробка ідеї стартапу	Маркетингові дослідження	Електроенергія, комп'ютер	14 діб	1 296,54 грн.
	Лабораторні дослідження	Хроматограф Agilent 1200 із мас-спектрометром Agilent G1956B, спектрофотометр DeNovix DS-11 FX +, електрофорез, лабораторний посуд, реактиви	5 років	2 457 500 грн.
Реалізація ідеї	Патентування інтелектуальної власності (ІВ)	Консультація, комп'ютер	3 місяці	60 000 грн.
Продаж проекту	Перемови із потенційними споживачами	Працівники	3 місяці	136 039,44 грн.
	Оформлення договору про передачу прав на ІВ	Консультація, комп'ютер	3 місяці	4 698 грн.

На основі визначених етапів визначено відповідальних за реалізацію бізнес-процесів стартап-проекту (табл. 3.21).

Таблиця 3.21 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи					
	Інженер другої категорії	Керівник	Спеціаліст із трансферу технологій	Старший науковий співробітник	Юрист з патентного права	Перекладач
Розробка ідеї	+	+		+		
Маркетингове дослідження	+					
Лабораторні дослідження	+	+		+		
Патентування ІВ			+		+	
Ведення перемовин		+	+	+		
Продаж патенту		+	+		+	+

3.6. Ризики стартап-проекту та методи управління ними

Перелік ризиків інноваційної розробки відповідно до стадій реалізації стартап-проекту наведено в таблиці 3.22.

Таблиця 3.22 – Ризики інноваційної розробки

Назва процесу / стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Маркетингові дослідження	Конкуренти або споживачі можуть мати власні більш перспективні розробки АФІ для майбутнього, менші перспективи	Недостатня інформованість з наявних джерел
	Лабораторні дослідження	Бельгійські вчені мають ідентичний штамп-продуцент, можуть випередити	Доопрацювання стартапу може не вкластися в один цикл

Продовження табл. 3.22

Реалізація ідеї	Патентування інтелектуальної власності (ІВ)	Випередження, «патентний тролінг»	Недостатня кваліфікація кадрів для такого масштабного проекту, мала мотивація
Продаж проекту	Перемови із потенційними споживачами	Можлива мала зацікавленість з боку фармацевтичних компаній	Недостатня кваліфікація кадрів для проведення перемовин на високому рівні
	Оформлення договору про передачу прав на ІВ	Спроби значно занизити ціну патенту	Відсутність мотивації втримати справедливую ціну патенту
		Втручання з боку державних органів, корупція	

Оцінка кожного ризику наведена в таблиці 3.23. Оцінка ризиків – визначення ступеня ризиків на основі експертних висновків за критеріями ймовірності настання ризиків та їх впливу на очікуваний результат.

Таблиця 3.23 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
Зовнішні ризики			
Науково-технічний ризик	Патентування штаму бельгійськими вченими ³	Середня	Високий
	Вихід більш перспективних АФІ ²	Середня	Середній
	Антибіотик для виробництва мазі менш привабливий для споживача ³	Середня	Високий
Політико-законодавчий ризик	Втручання державних органів влади, корупція ²	Середня	Середній

Продовження табл. 3.23

	Зміна законодавства щодо продаж ІВ іноземним державам ¹	Низька	Середній
	Реформування НАН України, передача земель інституту іншим структурам ³	Середня	Високий
Ринковий ризик	Зниження вартості патенту ²	Висока	Низький
Внутрішні ризики			
Інформаційний ризик	Недостатня інформованість з наявних джерел ¹	Середня	Низький
Виробничий ризик	Не вкладання в цикл ²	Середня	Середній
Ризик персоналу	Низька мотивація ³	Висока	Середній
	Недостатня кваліфікованість для масштабного проекту ²	Середня	Середній

¹ – зелена зона, ² – жовта зона, ³ – червона зона

Після заповнення табл. 3.23 визначили ризики, що знаходяться у червоній та жовтій зонах. Для обраних ризиків запропонували методи управління (табл. 3.24).

Таблиця 3.24 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Патентування штаму бельгійськими вченими	Прийняття ризику (самострахування)	Керівник	Розробка ідеї	Зниження впливу ризику
Антибіотик для виробництва мазі менш привабливий для споживача	Попередження (скорочення) ризику	Керівник	Розробка ідеї, продаж патенту	Зниження впливу ризику

Продовження табл. 3.24

Реформування НАН України, передача земель інституту іншим структурам	Прийняття ризику (самострахування)	Керівник	Розробка ідеї	Зниження впливу ризику
Низька мотивація персоналу	Попередження ризику (стратегічне планування діяльності)	Керівник	Розробка ідеї, продаж патенту	Зниження впливу ризику
Вихід більш перспективних АФІ	Прийняття ризику (самострахування)	Керівник	Розробка ідеї	Зниження впливу ризику
Втручання державних органів влади, корупція	Попередження ризику (стратегічне планування діяльності)	Керівник	Продаж патенту	Зниження впливу ризику
Зниження вартості патенту	Прийняття ризику (самострахування)	Керівник	Продаж патенту	Зниження впливу ризику
Недостатня кваліфікованість для масштабного проекту	Попередження ризику (стратегічне планування діяльності)	Керівник	Розробка ідеї, продаж патенту	Зниження впливу ризику

ВИСНОВКИ

1. Культуральна рідина *Pseudomonas batumici* УКМ В-321, продуцента антибіотика батуміну, проявляла найбільшу активність щодо представників роду *Staphylococcus*; зони затримки росту у розведенні 1:100 становили 24 ± 3 мм.
2. З культуральної рідини *P. batumici* УКМ В-321 екстраговано 5 антибіотично активних сполук, які охарактеризовано за їх фізико-хімічними властивостями. Для сполук 1-5 фактор розділення (R_f) становив: 0,42, 0,38, 0,31, 0,28, 0,25; максимум спектру поглинання ($\lambda_{\max}$): 226, 228, 231, 231, 229 нм; молекулярні маси (M_r): 505, 505, 548, 548 і 550 відповідно.
3. Виходячи з отриманих фізико-хімічних характеристик сполук, зроблено висновок щодо їх спорідненості до батуміну. Запропоновано хімічні структури і тривіальні назви цих речовин: дескарбамоїл батумін енол, дескарбамоїл батумін кетон, батумін кетон (батумін), батумін енол та 17-гідроксибатумін.
4. Кожна з п'яти сполук виявила найбільшу активність щодо тест-штамів роду *Staphylococcus*, зони затримки росту знаходилися в діапазоні 17 – 40 мм.
5. Найбільшою антибіотичною активністю характеризувався батумін в кето-формі, який, окрім антистафілококової дії, виявив помірну активність щодо тест-штаму *Escherichia coli* В-926; зона затримки росту 16 ± 2 мм.
6. Дані дослідження дали підґрунтя для розробки стартап-проекту «Технологія отримання антибіотика батуміну у вигляді АФІ» . Ціна інтелектуальної власності після завершення лабораторних досліджень антибіотика може сягати 4 894 645 000 гривень, згідно ринкових досліджень, проведених в даній роботі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pseudomonas. Model Organism, Pathogen, Cell Factory / Edited by Bernd H. A. Rehm // WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008. – 426p.
2. Brittan S. Scales Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans / Brittan S. Scales, Robert P. Dickson, John J. LiPuma, Gary B. Huffnagle // Clinical Microbiology Reviews – 2014. – 27(4): p. 927–948
3. Смирнов В. В. Бактерии рода *Pseudomonas* / Смирнов В. В., Киприанова Е. А.; Отв. ред. Айзенман Б. Е. // АН УССР, Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного.— Киев: Наук, думка, 1990.— 264 с.
4. Churkina L. N. Peculiarities of antibiotic batumin action on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas batumici* / L. N. Churkina, V. V. Klochko, S. D. Zagorodnya, L. V. Yaroshenko, O. B. Luitko // Biotechnologia Acta – 2018. – V. 11, No 2 – p.72-79
5. Ключко В.В. Антимикробный спектр антибиотика батумина / Ключко В.В., Киприанова Е.А., Чуркина Л.Н., Авдеева Л.В. // Мікробіологічний журнал, 2008, Т. 70, № 5, с. 41-46
6. Vitalii V. Klochko Prospects of a new antistaphylococcal drug batumin revealed by molecular docking and analysis of complete genome sequence of the batumin-producer *Pseudomonas batumici* UCM B-321 / Vitalii V. Klochko, Liubov B. Zelena, Ju Young Kim, Lilia V. Avdeeva, Oleg N. Reva // International Journal of Antimicrobial Agents – 2016. – №47 – p. 56-61
7. Oleg N Reva Comparison of structures and cytotoxicity of mupirocin and batumin against melanoma and several other cancer cell lines / Oleg N Reva, Sunelle Rademan, Michelle H Visagie, Maphuti T Lebelo, Mokgadi V Gwangwa, Vitalii V Klochko, Anna M Joubert & Namrita Lall // Future Medicinal Chemistry – 2019. – 11 (7) – p. 677–691
8. Hiramatsu K. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy / K. Hiramatsu, Y. Katayama, M. Matsuo, T. Sasaki, Y. Morimoto,

- A. Sekiguchi, T. Baba // *Journal of Infection and Chemotherapy* – 2014. – №20 – p. 593-601
9. Гарифуліна М.А. Характеристика стафілококів та їх роль у патології дітей / М.А. Гарифуліна, О.С. Воронкова, Т.М. Шевченко, А.І. Вінніков // *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Medicine* – 2014. – 5(2), с. 115–120.
 10. Timothy J. Foster Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects / *FEMS Microbiology Reviews* – 2017. – 41(3) – p. 430–449
 11. Maryn McKenna The antibiotic paradox: why companies can't afford to create life-saving drugs / *Nature* – 2020. – №584 – p. 338-341
 12. Zhou F Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study / Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B. // *Lancet* – 2020. – №395 – p. 1054–1062
 13. Zhu X Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases / Zhu X, Ge Y, Wu T, Zhao K, Chen Y, Wu B, Zhu F, Zhu B, Cui L // *Virus research* – 2020. – №285 – 198005
 14. Vaillancourt M. The unrecognized threat of secondary bacterial infections with COVID-19 / Vaillancourt M, Jorth P. // *mBio* – 2020. – 11(4) – e01806-20
 15. Christian Hertweck The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity / *Angewandte Chemie International Edition*. – 2009. – 48 – p. 4688 – 4716
 16. D. O Hagan The Polyketide Metabolites / *Ellis Horwood Series in Organic Chemistry*, Chichester: 1993, 250 p.
 17. J. Staunton Polyketide biosynthesis: a millennium review / J. Staunton, K. J. Weissman // *Natural product reports* – 2001. – №18 – p. 380 – 416
 18. D. A. Hopwood Genetic contributions to understanding polyketide synthases / *Chemical Reviews* – 1997. – №97 – p. 2465 – 2497
 19. B. Wilkinson Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways / B. Wilkinson, J. Micklefield // *Nature Chemical Biology* – 2007. – № 3 – p. 379 – 386

- 20.K. J. Weissman Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides // K. J. Weissman, P. F. Leadlay // *Nature Reviews Microbiology* – 2005. – № 3 – p. 925 – 936
- 21.W. Zhang Combinatorial biosynthesis of natural products / W. Zhang, Y. Tang, J. // *Journal of medicinal chemistry* – 2008. – № 51 – p. 2629 – 2633.
- 22.S. Horinouchi Combinatorial biosynthesis of non-bacterial and unnatural flavonoids, stilbenoids and curcuminoids by microorganisms / *The Journal of antibiotics* – 2008. – № 61 – p. 709 – 728
- 23.S. Smith The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases / S. Smith, S. C. Tsai // *Natural product reports* – 2007. – № 24 – p. 1041 – 1072
- 24.B. J. Rawlings Biosynthesis of fatty acids and related metabolites / *Natural Product Reports* – 1998. – № 15 – p. 275 – 308
- 25.J. G. Metz Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes / J. G. Metz, P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, R. Valentine, K. Lardizabal, F. Domergue, A. Yamada, K. Yazawa, V. Knauf, J. Browse // *Science* – 2002. – № 293 – p. 290 – 293.
- 26.U. Kaulmann Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids by Polyketide Synthases / U. Kaulmann, C. Hertweck // *Angewandte Chemie International Edition* – 2002. – № 41 – p. 1866 – 1869
- 27.R. S. Gokhale Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids / R. S. Gokhale, P. Saxena, T. Chopra, D. Mohanty // *Natural product reports* – 2007. – № 24 – p. 267 – 277
- 28.Jana Moldenhauer Biosynthesis of the Antibiotic Bacillaene, the Product of a Giant Polyketide Synthase Complex of the trans-AT Family / Jana Moldenhauer, Xiao-Hua Chen, Rainer Borriss, Joern Piel / *Angewandte Chemie International Edition* – 2007. – № 46 – p. 8195 – 8197
- 29.Klochko V.V. Biosynthesis and properties of antibiotic batumin / *Biotechnologia Acta* – 2014. – v. 7, №6. – p. 46 – 50

30. Інструкція з організації роботи бактеріологічних лабораторій в системі інфекційного контролю в акушерських стаціонарах МОЗ України; Інструкція, Правила від 10.05.2007 № 234
31. Высокоактивный антибиотик для лечения стафилококковой инфекции - батумин и диагностический препарат "Диастаф" на основе батумина [електронний ресурс] // режим доступу: <http://www.uintei.kiev.ua/transfer/offer.php?slang=rus&offid=2590> (14.02.2021 – Назва з екрану)
32. V. V. Klochko Genes encoding synthesis of phenazine-1-carboxylic acid in *Pseudomonas batumici* / V. V. Klochko, S. D. Zagorodnya, O. N. Reva // Biotechnologia Acta – 2016. – V. 9, No 5 – p. 45-53
33. Fujikawa H. Fractal Growth of *Bacillus subtilis* on Agar Plates / Fujikawa H., Matsushita M. // Journal of the Physical Society of Japan – 1989. – 58(11) – p. 3875–3878
34. Карпова С.І. Позаклітинні лектини сапрофітної бактерії *Bacillus subtilis* та її мутантів / Карпова С.І., Коваленко С.О., Корецька Н.В., Гетьман К.І. // Біополімери і клітина – 2004. – т. 20 №4 – с. 290-294
35. E.A. Kiprianova *Pseudomonas batumici* sp. Nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the caucasus black sea coast / E.A. Kiprianova, V.V. Klochko, L.B. Zelena, L.N. Churkina, L.V. Avdeeva // Мікробіологічний журнал – 2011. – Т. 73, № 5 – с. 3-8
36. T. J. Beveridge Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis* / T. J. Beveridge, R. G. E. Murray // Journal of bacteriology – 1980. – 141(2) – p. 876-887
37. Jeremy B. Fein The effect of Fe on Si adsorption by *Bacillus subtilis* cell walls: insights into non-metabolic bacterial precipitation of silicate minerals / Jeremy B. Fein, Sarah Scott, Nelson Rivera // Chemical Geology – 2002. – №182 – p. 265–273

38. Drew Gorman-Lewis Adsorption of aqueous uranyl complexes onto *Bacillus subtilis* cells / Drew Gorman-Lewis, Patricia E. Elias, Jeremy B. Fein // Environmental Science & Technology – 2005. – № 39 – p. 4906-4912
39. James S. Dickson Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces / James S. Dickson, Mohammad Koohmaraie // Applied and Environmental Microbiology – 1989. – 55(4) – p. 832-836
40. Min Cao The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function σ^X factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides / Min Cao, John D. Helmann // Journal of Bacteriology – 2004. – 186(4) – p. 1136–1146
41. Wesley Mattheus Isolation and purification of a new kalimantacin/batumin-related polyketide antibiotic and elucidation of its biosynthesis gene cluster / Wesley Mattheus, Ling-Jie Gao, Piet Herdewijn, Bart Landuyt, Jan Verhaegen, Joleen Masschelein, Guido Volckaert, Rob Lavigne // Chemistry & Biology – 2010. – № 17 – p. 149–159
42. Christopher D. Fage The Kalimantacin Polyketide Antibiotics Inhibit Fatty Acid Biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by Targeting the Enoyl-Acyl Carrier Protein Binding Site of FabI / Thomas Lathouwers, Michiel Vanmeert, Ling-Jie Gao, Kristof Vrancken, Eveline-Marie Lammens, Angus N. M. Weir, Ruben Degroote, Harry Cuppens, Simone Kosol, Thomas J. Simpson, Matthew P. Crump, Christine L. Willis, Piet Herdewijn, Eveline Lescrinier, Rob Lavigne, Jozef Ann, Joleen Masschelein // Angewandte Chemie International Edition – 2020. – № 132 – p. 2 – 10
43. В.В.Гладько Новые данные о микробиоме здоровой кожи и его значении в развитии дерматозов (обзор) / В.В.Гладько, С.А.Масюкова, С.С.Землякова, И.В.Ильина // Consilium Medicum. Dermatology – 2017. – № 4 – p. 17-24
44. Методичні рекомендації до лабораторного практикуму зі спецкурсу „Біологічні основи інфекційних процесів”, «Виділення та ідентифікація стафілококів» для студентів ННЦ «Інститут біології та медицини» - Київ, 2019

45. David R. Cameron Insights on virulence from the complete genome of *Staphylococcus capitis* / David R. Cameron, Jih-Hang Jiang, Karl A. Hassan, Liam D. H. Elbourne, Kellie L. Tuck, Ian T. Paulsen, Anton Y. Peleg // *Frontiers in Microbiology* – 2015. – №6 – article 980
46. J&J and GSK leaders in antibiotics research – report [электронный ресурс] // режим доступа: <https://pharmaphorum.com/news/jj-gsk-leaders-antibiotic-research-report/> (24.03.2021 – Назва з екрану)
47. Pfizer pledges \$100 million into AMR action fund to help fund antibiotic development and fight global threat [электронный ресурс] // режим доступа: <https://www.pfizer.com/news/hot-topics/pfizer-pledges-100-million-into-amr-action-fund-to-help-fund-antibiotic-development-and-fight-global-threat> (24.03.2021 – Назва з екрану)
48. Roche forges antibiotics pact as it sees beyond COVID-19 threats to public health [электронный ресурс] // режим доступа: <https://www.fiercebiotech.com/biotech/roche-forges-antibiotics-pact-as-it-sees-beyond-covid-19-threats-to-public-health> (24.03.2021 – Назва з екрану)
49. Sandoz announces plans for joint investment to help strengthen future of antibiotics manufacturing in Europe [электронный ресурс] // режим доступа: <https://www.novartis.com/news/media-releases/sandoz-announces-plans-joint-investment-help-strengthen-future-antibiotics-manufacturing-europe> (24.03.2021 – Назва з екрану)
50. Antibiotics 2.0: a new weapon against multidrug-resistant germs [электронный ресурс] // режим доступа: <https://www.merckgroup.com/en/research/science-space/envisioning-tomorrow/precision-medicine/multidrug-resistance.html> (24.03.2021 – Назва з екрану)
51. Despite Industry AMR Declaration commitments Sanofi quits R&D on anti-infectives [электронный ресурс] // режим доступа: <https://www.reactgroup.org/news-and-views/news-and-opinions/year-2018/despite-industry-amr-declaration-commitments-sanofi-quits-rd-on-anti-infectives/> (24.03.2021 – Назва з екрану)

52. Bulk API contract manufacturing [електронний ресурс] // режим доступу: <https://www.abbviecontractmfg.com/services/pharmaceutical-ingredients/bulk-api-contract-manufacturing.html> (24.03.2021 – Назва з екрану)
53. Eisai, Takeda and GARDP hunt for new antibiotics [електронний ресурс] // режим доступу: <https://pharmaphorum.com/news/eisai-takeda-and-gardp-hunt-for-new-antibiotics/> (24.03.2021 – Назва з екрану)
54. Lilly to focus on new drugs in China, unload antibiotics brands and manufacturing facility for \$375M [електронний ресурс] // режим доступу: <https://pharmaphorum.com/news/eisai-takeda-and-gardp-hunt-for-new-antibiotics/> (24.03.2021 – Назва з екрану)
55. Tucaliuc A. Mupirocin: applications and production / Tucaliuc A., Blaga A. C., Galaction A. I., Cascaval D. // Biotechnology Letters – 2019. – № 41 – p.495-502
56. Штам *Pseudomonas batumici* IMB B-7532 - продуцент антибіотика батуміну; пат. UA 107822 U Державна служба інтелектуальної власності України / Винахідники: Чуркіна Лариса Микитівна (UA), Кіпріанова Олена Андріївна (UA), Ключко Віталій Вікторович (UA), Авдєєва Лілія Василівна (UA); Власник: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України
57. Why big pharma has abandoned antibiotics [електронний ресурс] // режим доступу: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-02884-3> (29.03.2021 – Назва з екрану)
58. Нам деньги, им патент [електронний ресурс] // режим доступу: https://www.ligazakon.ua/news_old/ga011553.html (30.03.2021 – Назва з екрану)
59. Что такое VAT? Особенности оплаты НДС в Европе и Великобритании [електронний ресурс] // режим доступу: <https://cutt.ly/Qx6tVYK> (30.03.2021 – Назва з екрану)
60. Налог на добавленную стоимость (НДС) в Японии [електронний ресурс] // режим доступу: <https://take-profit.org/statistics/sales-tax-rate/japan/> (30.03.2021 – Назва з екрану)

61. Налоговая система Нью-Йорка: отчетность и оптимизация налогообложения LLC и физлиц (налог на прибыль и на прирост капитала) [электронный ресурс] // режим доступа: <https://gsl.org/ru/taxes/tax-zones/ssha-nyu-york/> (30.03.2021 – Назва з екрану)

ІНФОРМОВАНА ЗГОДА ПАЦІЄНТА

ПІБ пацієнта _____

Ми пропонуємо Вам передати біологічний матеріал зі шкіри потилиці голови у місцях абсцесу для проведення наукового дослідження.

Участь у даному дослідженні є повністю добровільною.

Якщо Ви виявите бажання надати такий зразок, тоді уважно прочитайте інформацію, надану Вам у цьому документі. Ви можете вільно поставити будь-які запитання, що можуть виникнути у Вас з цього приводу.

Мета дослідження:

Метою цього Дослідження є вивчення активності антибіотиків на клінічних штаммах.

Дослідники будуть використовувати бактеріальні ізоляти для проведення наступних аналізів:

Визначення філогенетичних характеристик штамів-ізолятів, тестування антибіотиків на даних ізолятах.

Використання біологічних зразків та інформації з дослідницькою метою: Ваші біологічні зразки в межах цього Дослідження будуть використані виключно із дослідницькою метою згідно міжнародного законодавства в сфері охорони здоров'я. Вони не будуть використані для будь якої іншої мети.

Медична інформація:

Для цього дослідження потрібні загальні відомості про Вас і деяка медична інформація. Вона може включати: Ваш діагноз, висновки і результати лабораторних і морфологічних досліджень. Ваші особисті дані (ім'я, прізвище, адреса, телефон тощо) ніколи не будуть передані дослідникам і не будуть входити в жодну наукову базу даних. Підписуючи

Додаток А (продовження)

надану Вам Інформовану згоду, Ви даєте згоду на розміщення Вашої анонімної клінічної інформації в одній і більше базах даних. Це сприятиме подальшим медичним дослідженням, даючи можливість іншим дослідникам використовувати цю інформацію для вивчення спектру дії антибіотичних речовин.

Додаткова інформація:

Підписавши цю Інформовану згоду, Ви надаєте свою письмову згоду на забір і передачу ваших зразків. А також на доступ до Ваших медичних даних Організатора дослідження протягом 3 років з дати підписання Вами цього документу, впродовж зберігання медичної інформації в архіві наукової установи.

ПІБ пацієнта _____

Підпис пацієнта _____

Дата: « _____ » _____ 20__ р. Час: _____ :

Мій підпис нижче означає, що я прочитав або мені прочитали зрозумілою мені мовою всю інформацію, яка міститься в цій Інформованій згоді. Значення цієї інформації мені було роз'яснено і цілком зрозуміле. Я мав час і можливість поставити питання про дослідження. На всі питання я отримав відповідь. Я прочитав усі сторінки цієї Інформованої згоди, у тому числі розділи про ризик і винагороду. Я засвідчую, що мені виповнилось вісімнадцять (18) або більше років. Я також засвідчую, що вся інформація, яку я надав, у тому числі мої медичні дані, наскільки мені відомо, вірні і точні. Я не відмовляюсь від жодного із моїх законних прав, підписуючи цю Інформовану згоду.

Я пояснив (-ла) суть Дослідження вказаному вище пацієнтові і він виявив бажання взяти участь.

ПІБ дослідника _____

Підпис дослідника _____

Дата: « _____ » _____ 20__ р. Час: _____ :

Додаток Б

Таблиця для зчитування результатів тест-системи API Staph Biomerieux

Тест	Активний інгредієнт	Кількість (мг/лунка)	Реакції / ензими	Результат	
				Негативний	Позитивний
0	Без субстрату	-	Негативний контроль	червоний	-
GLU	D-глюкоза	1.56	D-глюкоза	червоний*	жовтий
FRU	D-фруктоза	1.4	(окиснення) D-фруктоза		
MNE	D-маноза	1.4	(окиснення) D-маноза		
MAL	D-мальтоза	1.4	(окиснення) D-мальтоза		
LAC	D-лактоза	1.4	(окиснення) D-лактоза		
TRE	D-трегалоза	1.32	(окиснення) D-трегалоза		
MAN	D-манітол	1.36	(окиснення) D-манітол		
XLT	ксилітол	1.4	(окиснення) ксилітол		
MEL	D-мелібіоза	1.32	(окиснення) D-мелібіоза		
NIT	калію нітрат	0.08	відновлення нітратів до нітритів	безбарвно-рожевий	червоний
PAL	β-нафтил фосфат	0.0244	алкінфосфатаза	жовтий	фіолетовий
VP	натрію піруват	1.904	ацетил-метилкарбінол (біосинтез)	безбарвно-рожевий	червоно-фіолетовий
RAF	D-рафіноза	1.56	(окиснення) D-рафіноза	червоний	жовтий
XYL	D-ксилоза	1.4	(окиснення) D-ксилоза		
SAC	D-сахароза	1.32	(окиснення) D-сахароза		
MDG	метил-αD-глюкопіранозит	1.28	(окиснення) метил-αD-глюкопіранозит		
NAG	N-ацетил-глюкозамін	1.28	(окиснення) N-ацетил-глюкозамін		
<u>ADH</u>	L-аргінін	1.904	аргініндігідролаза	жовтий	оранжево-червоний
<u>URE</u>	сечовина	0.76	уреаза	жовтий	червоно-фіолетовий

* Коли MNE чи XLT передусє позитивний, чи наступний тест є позитивний, оранжевий колір слід враховувати як негативний результат.

Додаток В

Відсоток позитивних реакції після 18-24 годин при 37 °С

Вид	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	100	95	96	88	91	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	100	99	36	72	10	90	9	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	100	99	80	43	22	2	36	0
<i>Staphylococcus caprae</i>	100	99	70	10	75	74	10	0
<i>Staphylococcus camosus</i>	100	100	99	0	99	99	99	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	100	100	99	79	100	100	13	0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	100	99	56	99	2	97	88	0
<i>Staphylococcus cohnii</i> <i>spp.urealiticum</i>	100	100	99	98	98	100	94	33
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	99	70	99	81	2	0	64
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99	75	5	99	80	91	60	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	98	94	41	97	50	86	28	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	100	99	99	0	87	99	0	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	100	100	100	100	100	100	100	7
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	100	89	88	99	66	99	0	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100	99	2	97	90	99	88	22
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	100	80	100	0	1	71	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	99	99	99	99	70	93	98	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	100	100	57	11	95	92	73	4
<i>Staphylococcus warneri</i>	99	99	50	98	19	96	70	0
<i>Staphylococcus xylosus</i>	100	100	92	81	85	95	90	30
<i>Kocuria kristinae</i>	99	96	99	90	9	84	3	0
<i>Kocuria varians/rosea</i>	91	92	8	1	1	8	1	0
<i>Micrococcus spp.</i>	2	4	0	1	0	1	0	0

Додаток В (продовження)

Вид	MEL	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	<u>ADH</u>	<u>URE</u>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1	0	97	2	90	80	80
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	0	0	40	0	15	90	1
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	0	0	50	0	1	85	35
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	0	0	0	0	1	99	60
<i>Staphylococcus camosus</i>	0	0	0	0	0	100	100	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	0	1	100	0	31	89	95
<i>Staphylococcus cohnii</i>	0	0	0	2	0	9	2	1
<i>Staphylococcus cohnii</i> <i>spp.urealiticum</i>	0	0	0	0	0	98	0	99
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1	0	97	4	18	73	88
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	0	0	98	13	83	85	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	1	0	97	4	50	43	84
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	0	0	99	2	93	100	68
<i>Staphylococcus lentus</i>	99	100	100	100	28	100	0	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0	100	0	90	1	50
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	1	0	96	1	70	30	65
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0	0	0	0	0	94	99	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	0	16	95	7	68	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	0	4	97	2	90	97	84
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	0	0	99	0	6	77	97
<i>Staphylococcus xylosus</i>	9	11	82	87	10	80	5	90
<i>Kocuria kristinae</i>	0	0	0	90	12	0	0	0
<i>Kocuria varians/rosea</i>	0	4	8	4	0	1	1	29
<i>Micrococcus spp.</i>	0	0	0	1	0	1	11	11