

MOSCOW INSTITUTE OF PHYSICS AND TECHNOLOGY
(MIPT, PHYSTECH)

Manuscript copy

Heakal Abdelhakem Abdelaziz Mohamed

**STUDY OF THE ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF DISPERSIVE
SYSTEMS BASED ON THE BLACK SOLDIER FLY (*HERMETIA ILLUCENS*)
LARVAE FAT AND THE PROSPECTS OF THEIR USE IN MEDICINE,
VETERINARY AND CROP PROTECTION**

Scientific specialty 1.5.11. Microbiology

Thesis for a degree of Candidate of Biological Sciences

Scientific supervisor:

Elena Ivanovna Marusich

Candidate of Biological Science, PhD

Moscow

2022

Table of Contents

Introduction	7
Chapter 1. Literature review	16
1.1. <i>Hermetia illucens</i> fly.....	16
1.1.1. <i>Hermetia illucens</i> classification and life cycle.....	16
1.1.2. Importance of <i>H. illucens</i> larvae.....	17
1.1.3. Effect of rearing substrate on BSFL fatty acids composition.....	18
1.1.4. Effect of extraction procedures on the fatty acid composition of <i>H. illucens</i> larvae.....	20
1.1.5. Dispersive systems formation through <i>H. illucens</i> larvae fat extraction.....	21
1.1.6. Classification of lipids and fatty acids	22
1.2. Antibiotics.....	24
1.2.1. Antibiotics as antibacterial agents.....	24
1.2.2. Antibiotic's resistance.....	25
1.2.3. Reasons of antibiotic's resistance.....	25
1.2.4. Mechanisms of antibiotic's resistance.....	26
1.3. Fatty acids as natural bioactive substances.....	27
1.3.1. Spectrum of antibacterial potency of fatty acids.....	27
1.3.2. Mechanisms of antibacterial activity of fatty acids.....	31
1.3.2.1. Membrane permeability and cell lysis.....	31
1.3.2.2. Disrupting electron transport chain and uncoupling oxidative phosphorylation.....	33
1.3.2.3. Inhibiting activity of bacterial enzymes.....	34
1.3.2.4. Peroxidation and autoxidation.....	35
1.4. Fatty acids disrupt pathogenic bacteria biofilms.....	35
1.5. Fatty acids fight against most important phytopathogenic bacteria in crops protection	36
1.6. <i>H. illucens</i> larvae utility in aquaculture and veterinary industry	38
1.7. <i>H. illucens</i> larvae fat eradicates MDR human pathogenic bacteria strains.....	42
1.8. Fatty acids cytotoxicity.....	44
Chapter 2. Experimental methods of research	45
2.1. Biological materials	45
2.2. Chemical reagents.....	45
2.3. Culture media.....	46
2.4. Bacteria cultivation conditions.....	47
2.5. <i>H. illucens</i> larvae fat extraction.....	47
2.6. Determination of antimicrobial properties of <i>H. illucens</i> larvae fat extracts.....	47

2.6.1. Agar disk diffusion assay.....	47
2.6.2. Turbidimetric assay.....	48
2.6.3. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by turbidimetric assay.....	49
2.6.4. Determination of the half of inhibitory concentration (MIC50).....	49
2.6.5. Determination of minimum bactericidal concentration (MBC).....	49
2.7. Multidrug-resistant assessment.....	49
2.8. Bacterial resistance assays.....	50
2.9. <i>K. pneumoniae</i> biofilm analysis.....	50
2.9.1. Biofilm formation.....	50
2.9.2. Autoaggregation assay.....	51
2.9.3. Mucoviscosity, string, and precipitation assays.....	51
2.9.4. Hydrophobicity test.....	51
2.10. Bacterial virulence factors validation through motility assays.....	52
2.10.1. Swarming motility	52
2.10.2. Swimming motility.....	52
2.10.3. Twitching motility.....	52
2.11. Inhibition of biofilm formation by AWME3.....	53
2.12. Inhibition of mature biofilms formed by <i>K. pneumoniae</i> strains by AWME3 treatments.....	53
2.13. Inhibition of mixed biofilms formed by <i>K. pneumoniae</i> strains by AWME3 treatments.....	54
2.14. Disruption of <i>K. pneumoniae</i> membrane by AWME3.....	54
2.14.1. Relative electric conductivity.....	54
2.14.2. Crystal violet uptake assay.....	55
2.14.3. Ethidium bromide uptake assay.....	55
2.15. Biofilm disruption by AWME3 visualized through microscopy techniques.....	55
2.15.1. Light microscopy.....	55
2.15.2. Fluorescence microscopy.....	56
2.15.3. Scanning electron microscopy (SEM).....	56
2.16. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of AWMEs analysis.....	57
2.17. Mechanism of AWME3 antibacterial action against MDR <i>S. aureus</i> ATCC 55804 and <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 strains.....	57
2.17.1. Bacterial morphological changes visualized by SEM microscopy after AWME3 treatments.....	57
2.17.2. Alteration of bacterial cell compartments visualized by transmission electron microscopy.....	58
2.17.3. Changes in bacterial cell dimensions determined by atomic force microscopy (AFM).....	58

2.17.4. Salt tolerance assay.....	59
2.17.5. Time- killing assay.....	59
2.17.6. Cytoplasmic contents leakage assay.....	60
2.17.7. Almar blue assay.....	60
2.17.8. Intracellular ATP assay.....	61
2.17.9. Propidium iodide uptake (PI-Uptake) assay.....	61
2.18. MTT cytotoxicity assay.....	62
2.19. Statistical processing of results.....	62
Chapter 3. <i>Hermetia illucens</i> larvae fat inhibit and eradicate phytopathogenic bacteria.....	63
3.1. Bioactive compounds extracted from the <i>H. illucens</i> larvae fat.....	63
3.2. Inhibition zone diameter measurements using disk diffusion assay.....	65
3.3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of AWME extract.....	67
3.4. Values of the 50% inhibitory concentration (MIC50) of AWME effective against the plant pathogenic bacteria.....	68
3.5. The potency of AWME from larvae fat on bacteria growth curves.....	70
3.6. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of AWME extract.....	72
Chapter 4. Sequential extracts of <i>H. illucens</i> larvae fat eradicate pathogenic fish bacteria.....	78
4.1. Antibiotic susceptibility testing.....	78
4.2. Sequential extraction of BSFL fat.....	80
4.3. Antibacterial susceptibility testing of <i>Aeromonas</i> spp. to SEs treatments.....	81
4.4. AWME3 demonstrates dose-dependent antimicrobial activity.....	84
4.5. Antibacterial susceptibility testing of <i>Aeromonas</i> spp. to SEs by MIC and MBC assays.....	85
4.6. The MIC50 and growth curves of AWME3 against <i>Aeromonas</i> spp.....	87
4.7. GC-MS analysis of the sequential extracts from BSFL fat.....	91
Chapter 5. Effect of <i>H. illucens</i> larvae fat AWME3 extract on XDR and MDR human pathogenic bacteria and eukaryotic HEK-293 cells.....	98
5.1. MDR assessment of human <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains.....	98
5.2. Antibacterial activity of AWME3 against <i>K. pneumoniae</i> strains.....	102
5.3. Determination of the MIC50 values of AWME3 extract against <i>K. pneumoniae</i> strains.....	107
5.4. Assessment of human bacterial pathogens resistance to AWME3 treatment	109
5.5. Cytotoxicity of AWME3.	110
Chapter 6. AWME3 from <i>H. illucens</i> larvae fat disrupts and eradicates biofilms formed by hypermucoviscous <i>K. pneumoniae</i> strains.....	112

6.1. Biofilm formation	112
6.2. Effect of AWME3 on biofilm formation factors.....	113
6.2.1. Aggregation and precipitation assays.....	113
6.2.2. String test.....	114
6.2.3. Hydrophobicity assay.....	115
6.2.4. Effect of AWME3 from BSFL fat on <i>K. pneumoniae</i> strains motility.....	117
6.3. Eradication of single and mixed biofilm established by MDR <i>K. pneumoniae</i> strains	120
6.4. AWME3 eradicates mature biofilms established by MDR <i>K. pneumoniae</i> strains.....	123
6.5. Permeabilisation of bacterial cell membrane by AWME3.....	124
6.5.1. Bacteria cell membrane permeability.....	124
6.5.2. Crystal violet uptake.....	126
6.5.3. Ethidium bromide uptake.....	127
6.6. Disrupted mature biofilm visualized by light microscopy.....	128
6.7. Fluorescence microscopy by propidium iodide.....	129
6.8. Disrupted biofilm visualized by SEM.....	131
Chapter 7. Potential mechanism of AWME3 action against MDR human pathogenic bacteria.....	133
7.1. Antimicrobial susceptibility patterns and MDR assessment of human pathogenic bacteria.....	133
7.2. Antibacterial activity of AWME3 against MDR <i>S. aureus</i> ATCC 55804 and <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 strains.....	134
7.3. Bactericidal AWME3 activity against MDR human pathogenic bacteria strains.....	136
7.4. Effect of AWME3 on bacterial growth curves	137
7.5. Elucidation bacterial cell viability <i>via</i> MIC50 assessment	139
7.6. Time kill curves study.....	141
7.7. Salt tolerance effect	143
7.8. Assessment of the bacterial cell membrane integrity.....	145
7.9. Leakage of cellular cytoplasmic materials.....	147
7.10. Intracellular ATP leakage.....	148
7.11. Alteration in cell morphology of <i>S. aureus</i> ATCC 55804 and <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 strains treated with AWME3.....	149
7.12. Alterations of cell compartments of <i>S. aureus</i> ATCC 55804 and <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 strains after exposing to AWME3.	153
7.13. Atomic Force Microscopy	156
7.13.1. AFM images of <i>S. aureus</i> ATCC 55804 control cells.....	156
7.13.2. AFM images of <i>S. aureus</i> ATCC 55804 cells treated by AWME3 at low concentrations.....	157

7.13.3. Decreasing of <i>S. aureus</i> ATCC 55804 cells dimensions under AWME3 treatment.....	160
7.13.4. Changes in bacterial surface roughness (Ra) and root mean square of roughness (RMS) values.	160
7.13.5. Changes of <i>S. aureus</i> ATCC 55804 cells morphology parameters.....	161
7.13.6. AFM images of <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 control cells.....	162
7.13.7. Effect of low AWME3 concentrations on the <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 cells morphology.....	164
7.13.8. Effect of high AWME3 concentrations on the <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 cells morphology....	165
Main Results and Conclusion.....	168
List of Abbreviations and Symbols.....	171
Acknowledgements.....	173
References.....	174
Appendix.....	213

INTRODUCTION

The relevance of the research topic

The topic of the dissertation is relevant for the exploration and production of new natural bioactive compounds isolated from *Hermetia illucens* larvae fat, which are able to eradicate multidrug resistant bacteria that are widely spread in agriculture, medicine, and veterinary fields. Many strains of bacteria are responsible for causing several diseases around the world; these diseases are widely spread in plants, animals and human. Plant pathogenic bacteria including, *Dickeya* spp., *Pectobacterium* spp., *Pantoea* spp., *Agrobacterium* spp., and *Xanthomonas* spp. These species cause severe infections and diseases, which are capable of killing the plant cell or tissues causing a big loose in economical crops [1].

Aquaculture considers a massive section of veterinary field, which confronts several problems, in particular the emergence of diverse fish diseases, where bacteria is an essential fish pathogen causing mortality and productivity economic losses in aquaculture. *Aeromonas* spp., are the most common bacteria in freshwater and saline habitats frequently associated with severe infections in cultured fish species. Through the consumption of contaminated fish, bacteria or toxins can be transmitted to humans causing sever diseases in gastrointestinal tract, kidneys, reproductive system, cardiovascular system, and others. The species of *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida*, and *A. veronii* cause several diseases in many fish types such as, loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Atlantic salmon (*Salmo salar*) and common carp (*Cyprinus carpio*) [2,3].

Nosocomial infections are associated with different toxins or infectious agents that cause infection among patients admitted to the hospital. These infections are mostly spread through hospital boundaries during the patient's hospital stay or even healthy individuals. Nosocomial bacteria include *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp., are known as "ESKAPE" organisms. These organisms or superbugs are returning in new forms to be resistant to almost all clinically significant antimicrobials. Eighty percent of the nosocomial infections are formed as nosocomial pneumonia infection, nosocomial urinary tract infections, nosocomial surgical site infections, and nosocomial bloodstream infection [4,5].

Several recent investigations reported the emergence of multidrug-resistant (MDR) bacterial pathogens from different origins including humans, birds, cattle, and fish that increase the need for new potent and safe antimicrobial agents. Besides, the routine application of the antimicrobial susceptibility testing to detect the antibiotic of choice as well as the screening of the emerging MDR strains [6]. As resistance and virulence increases, the cost and burden on society increases as well, the damaging effects of the antimicrobial resistance are already manifesting themselves across the world. Antimicrobial resistant infections currently claim at least 50,000 lives each year across Europe and the US alone, with many hundreds of thousands more dying in other areas of the world. Latest findings

suggest that drug resistant infections could kill an extra 10 million people across the world every year by 2050 if they are not tackled [7]. Besides, these species establish resistant biofilms that require developing new therapeutic agents to be eliminated.

Currently, the standard treatments for bacterial infection in three scopes (agriculture, veterinary, medicine) are antibiotics, vaccines, and chemical treatments. Albeit, these treatments have limitation for the use, side effects, low efficacy, and antibiotic-resistant bacteria generation.

H. illucens, which are a promising insect with high level of sustainability, producing eco-friendly biomolecules with high biological and economic value, including proteins and lipids abundant in its larvae. Antimicrobial peptides are costly to be produced in sufficient quantities to be used as therapeutics compared to antimicrobial lipids, which are abundant in many natural sources (insects, plants, marine organisms) and exhibit broad-spectrum and strong antimicrobial activity [8]. The antibacterial properties of fatty acids (FAs) have been known for a long time. Several studies on new antimicrobial agents have led to FAs being considered as next generation for antibiotics to combat MDR bacteria, further, plants, algae, and animals produce FAs to defend against pathogens [9].

Consequently, urgent needs for safe natural antimicrobial agents to fight against MDR-bacteria, the FAs and their derivatives extracted and screened from *H. illucens* larvae fat are considered sustainable bioactive compounds with high potency and therapeutic applications in several approaches. The most relevant in this study that MDR bacteria strains did not induce resistance to FAs compounds, this will pave the way and open the door for these bioactive molecules to be alternatives therapeutic for antibiotics, fighting superbugs in many fields including medicine, veterinary and agriculture [10]. Additionally, FAs proved high efficiency to eradicate not only the planktonic MDR pathogenic cells, but also, disrupted and eradicated the adherent cells in biofilms. Study the antibacterial mode of action of FAs against broad spectrum microbes effectively motivate researchers and microbiologists to understand the actual interactions between bacteria and living organisms to formulate the potential agent for treatment and reduce the virulence and pathogenicity of these severe microbes.

Aims and objectives of the present study

The aim of this study is exploring and extraction of new biologically active compounds in dispersive systems from *H. illucens* larvae fat, identification, characterisation, evaluation the efficacy and elucidation the mechanism of action of these active compounds against MDR phytopathogenic bacteria, veterinarian pathogenic bacteria, human nosocomial bacteria, and bacterial biofilms.

The main objective of this research was to investigate the role and mechanism of action of bioactive compounds in particular fatty acids and their derivatives, which were isolated from *H. illucens* larvae fat against MDR bacteria strains.

To achieve this goal the following tasks were solved:

1. To develop and formulate the extraction solution for extraction of free fatty acids (FFAs) through dispersive systems from *H. illucens* larvae fat.
2. To identify and characterize of *H. illucens* larvae fat extracts content (AWMEs).
3. To evaluate the antimicrobial activities of FAs and their derivatives abundant in AWMEs extract against phytopathogens and its ability for crop protection.
4. To evaluate the antimicrobial activities of FAs and their derivatives in AWME3 extract against *Aeromonas* diseases and its prospects to treat microbial infections in aquaculture.
5. To evaluate the antimicrobial activities of FAs and their derivatives in AWME3 extract against human pathogens and its prospects to use in medicine to eradicate nosocomial bacterial infections.
6. Molecular biological study of the mechanism of antimicrobial activity of FAs and their derivatives from AWME3 extract against broad spectrum of bacterial pathogens.
7. Study the effect of FAs and their derivatives in AWME3 on the bacterial biofilms disruption established by different hypervirulent mucoviscuos *K. pneumoniae* strains.
8. The study of the effect of FAs and their derivatives in AWME3 on the bacterial virulence factors inhibition, including motility, adhesion, and mucoviscosity.
9. The study of the resistance induced by different bacterial pathogens against FAs and their derivatives in AWME3, compared to various antibiotics.
10. The study of the biosafety of using FAs and their derivatives in AWME3 for human based on cytotoxicity assessment against normal human kidney HEK-293 cells.

Scientific novelty of the results

1. For the first time was developed the extraction solution for bioactive compounds isolated from *H. illucens* larvae fat, which composed of distilled water, methanol, and hydrochloric acid in a ratio 90:9:1 (v/v).
2. New protocol was developed to extract and isolate sustainable bioactive substances from *H. illucens* larvae fat (AWMEs extracts) *via* dispersive systems emulsion.
3. Our study focused for the first time on free fatty acids (FFAs) content of AWME3 extract from *H. illucens* larvae fat as major antibacterial agents against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria strains.
4. The development of the sequential extraction procedure allowed enriching and enhancing the activity of FFAs isolated from *H. illucens* larvae fat against all tested pathogenic bacteria.
5. For the first time was demonstrated that the percentages of oleic acids, *cis*-isomers increased during sequential extraction could pave the way for *H. illucens* larvae oil to utilize as a

sustainable biomass, and possess new practical applications in prospects of their use in medicine, veterinary and crop protection.

6. Our results have demonstrated that different MDR bacteria strains did not induce any resistance to FAs and other derivatives in AWME3 extract, while high resistance induced against different classes of antibiotics.
7. For the first time was shown the ability of AWME3 to eradicate the biofilms formed by some mortal bacteria.
8. Mechanism of FAs and their derivatives in AWME3 antimicrobial actions was demonstrated for the first time through the number of biological assays on cellular and molecular levels, including cell wall degradation, cell membrane, protein, genetic material, and ions leakage based on different microscopy techniques applications, such as scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and atomic force microscopy (AFM).
9. AWME3 was tested for the first time against human kidney cell lines HEK-293, and exhibited high selectivity to kill MDR-bacteria without killing HEK-293.

Theoretical and practical significance of the work

The results of this research contribute to the expansion of theoretical knowledge related to biochemistry and microbiology of FAs molecules, where the discovery of the composition of the extraction solution will expand our knowledge to understanding of the mechanism of chemical reactions evolved between the oil of BSFL and acidic-water-methanol reagent. Methods of FFAs and its esters sequential extraction presented in this work can be used in the production of large-scale number of bioactive compounds from BSFL fat formed in emulsion of dispersive systems. The discovery of the AWME3 extract formulation through the dispersive systems, isolated from the BSFL oil, can contribute to greater understanding of the role of FAs and FAs esters in the inhibition and eradication of pathogenic bacteria strains. In addition, the obtained results could be essential for understanding of the mechanisms of FAs and their derivatives of disruption and killing the MDR bacteria strains distributed in crops, aquacultures, and human *in vitro* and *in vivo*. The topic of this study was approved as a new PhD program in biological sciences in medical biological school of MIPT University; furthermore, these results can be studied for master degree of biotechnology.

The practical significance of the work is that the scientifically proved data can be translated to the agriculture, industry, and medicine, where the sequential extraction method produce a great amount of FFAs and glycerol, which can be fractionated in dispersive systems. The FFAs, glycerides, and glycerol can be used in many industrial applications, including cosmetics, food additives and others. Additionally, they could be effective therapeutic to eradicate planktonic of phytopathogenic, fish pathogenic, and human pathogenic bacteria or adhered cells of biofilms formed by human MDR pathogenic strains to be

applicable widely in the healthcare sector. These results can be utilized for more rational design of novel natural drugs based on a combination of fatty acids and its derivatives for their particular application in medicine, veterinary, and crop protection.

Methodology and research methods

The work of this study uses advanced methods of microbiology, biochemistry, molecular and cell biology, and methods of analytical chemistry. The methodology applied in accordance to the purposes of each stage of the dissertation research. The objects of the study were *H. illucens* larvae fat, MDR strains of phytopathogenic bacteria, fish pathogenic bacteria, human pathogenic bacteria, and human kidney HEK-293 cells. Extraction and separation of bioactive molecules from the lipid part of *H. illucens* larvae conducted using various extraction and purification techniques. Isolation and determination of FFAs comprised of *H. illucens* larvae fat extracts carried out by GC-MS technique compared with NIST-08 library. The evaluation of the antibacterial activity of FFAs and derivatives was carried out by the values of inhibition zone diameter (IZD), minimum inhibitory concentration (MICs), minimum bactericidal concentration (MBCs), the 50% of the minimum inhibitory concentration (MIC50), killing time kinetics, bacteriolysis assays. Resistance to FAs in AWME3 or antibiotics implemented using resistance assay. Cell viability, cell wall damage, cell membrane permeability, cytoplasmic content leakage, intracellular ATP, microscopy techniques, and other assays assessed the elucidation of the mechanism of action of FAs and derivatives in AWME3. The biological safety of FAs in AWME3 to human was determined by cytotoxicity MTT assay against normal HEK-293 cells. Statistical data processing was carried out using the program graph pad prism 7 software and Microsoft Excel.

The statements submitted for defence

1. A novel extraction solution was proposed for extraction of free fatty acids (FFAs) and their derivatives from *H. illucens* larvae fat, and composed of MQ water, methanol, and hydrochloric acid with ratio 90:9:1 (v/v) and 4.33% (w/w) yield of extract.
2. Was developed a new sequential procedure of three rounds of extraction in order to receive the most sustainable and antimicrobial active AWME3 extract from *H. illucens* larvae fat.
3. The antimicrobial activity of AWME3 obtained by sequential extraction method was tested against *K. pneumoniae* (ATCC BAA-2473), *K. pneumoniae* KPM9, *K. pneumoniae* KPi1627, *Aeromonas hydrophila* (ATCC 49140), *Aeromonas salmonicida* (ATCC 33658), *Pantoea agglomerans* (ATCC 27995), *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (ATCC 13951), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (ATCC 15713), *Pectobacterium atrosepticum* (ATCC BAA-672D), *Dickeya solani* (NCBI IPO 2222), *Staphylococcus aureus* (ATCC 55804), and *Acinetobacter baumannii* (ATCC BAA-2900), pathogenic bacteria.

4. The combination of saturated and unsaturated fatty acids (SFAs, USFAs), and its derivatives are able to inhibit and eradicate the most important phytopathogenic bacteria including, *Pantoea agglomerans*, *Xanthomonas campestris*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, and *Dickeya solani* with MIC 0.78 mg/mL, and MBC 0.78-1.56 mg/mL of FFAs.
5. AWME3 extract isolated from *H. illucens* larvae fat demonstrated the high antibacterial potency against hypermucoviscous *K. pneumoniae* strains with MIC and MBC 0.25 mg/mL. AWME3 is able to eradicate the clinical *K. pneumoniae* KPi1627 and environmental *K. pneumoniae* KPM9 isolates, which are classified as a multidrug-resistant (MDR) strains and the extensive drug resistant (XDR) NMD1- *K. pneumoniae* ATCC-BAA 2473, which leading to high mortality rates during severe nosocomial infections.
6. AWME3 extract showed inhibition and elimination efficacy in biofilm formation by *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 *K. pneumoniae* KPM9, *K. pneumoniae* KPi1627 strains. The virulence factors of motility and mucoviscosity of the biofilm formation were significantly reduced when *K. pneumoniae* strains treated with the sub-MIC (0.125 mg/mL) of AWME3. Furthermore, AWME3 eradicate the mature biofilms formed by *K. pneumoniae* strains at 1.0 mg/mL compared to the reference used antibiotic (Dox), which could not disrupt the mature biofilms at 4.0 mg/mL.
7. Tested human MDR bacteria, including *K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9, *S. aureus* ATCC 55804, *A. baumannii* ATCC 19606 and XDR, including *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain did not induce resistance to AWME3 during 16 passages after treatment with 0.125x MIC of AWME3, while high significant resistance (Fold of change in MIC>256) was induced after treatment with different categories of antibiotics.
8. FFAs of AWME3 show bactericidal (MIC₅₀<0.25 mg/mL) activity to all human MDR bacteria strains such as, *K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9, *S. aureus* ATCC 55804, *A. baumannii* ATCC 19606 and XDR *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain, while it was safe for normal human kidney HEK-293 cells (IC₅₀ 0.256 mg/mL).
9. Kinetics of time killing by AWME3 recorded 5 and 10 min for *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 strains treated with 4 MIC of AWME3, while it was extended to 12 h and 24 h when these strains subjected to 4 MIC of antibiotic (P/S).
10. Mechanism of antibacterial actions of FAs and derivatives in AWME3 was described through multiple routes including: (1) increasing of the cell membrane permeability and rigidity due to osmosity and membrane pore formation; (2) the cell wall damage because of the blocking of cell wall enzymatic process; (3) cell membrane disruption through reducing membrane fluidity due to USFAs effect; (4) the alteration of the bacterial cell dimension, morphology and

compartmentalization visualized *via* atomic force microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy; (5) the impairment of electron transport chain in the bacterial cell treated by AWME3, furthermore FAs hydrophobicity form like liposome around the bacterial cell, which block all metabolic processes, and finally leading to the cell death.

Reliability and approbation of the research results

All experiments were performed in the laboratory of Innovative drugs development and agro biotechnology at Moscow institute of physics and technology (National research university), (MIPT), and research institute of virology, Moscow. The results were obtained as an average from three independent experiments. The methods of variation statistics confirmed the degree of reliability of the obtained experiments. The conclusions were reliable at the accepted level of confidence $p=0.95\%$. Based on the thesis work results were published in 6 articles, among them 3 articles were published in peer-reviewed journals indexed by Web of Science and Scopus, and 3 articles were published in international conferences proceedings. In addition, the research findings were presented and discussed in 11 international conferences.

The work was supported by grants: Ministry of education and science of the Russian Federation (Agreement No. 02.A03.21.0003), and state assignment of PSCBR RAS, project AAAA-A20-120101390066-3.

Dissertation structure. The dissertation work was implemented in the laboratory of innovative drugs development and agrobiotechnology, at Moscow institute of physics and technology (National research university), phystech school of biological and medical physics, department of innovative pharmaceuticals, medical equipment and biotechnology. The dissertation contains an introduction, 7 chapters, a conclusion, and a list of 391 references and appendix. It is written on 223 pages of type written text, includes 55 figures, 27 tables, and appendix including 8 supplementary figures and 3 supplementary tables.

Personal contribution of the author

The experimental data presented in the work were obtained personally by the author on the all stages of the implementation of the dissertation work. The author conducted, designed and implemented all the experimental work and statistical analysis, and presented these results for scientific analysis. Together with the scientific supervisor and the head of laboratory, he prepared and published the scientific articles based on the obtained data.

Author's publications on the dissertation topic

1. [Indexed in Web of science and Scopus, **Q1, IF: 6.064**] **Mohamed, H.**; Marusich, E.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Bacterial outer membrane permeability increase underlies the bactericidal effect of fatty acids from *Hermitia illucens* (Black soldier fly) larvae fat against hypermucoviscous

isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol* **2022**, *13*.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.844811>.

2. [Indexed in Web of science and Scopus, **Q1, IF: 6.208**] **Mohamed, H.**; Marusich, E.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Fatty acids-enriched fractions of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) larvae fat can combat MDR pathogenic fish bacteria *Aeromonas* spp.//*Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 8829. <https://doi.org/10.3390/ijms22168829>.
3. [Indexed in Web of science and Scopus, **Q2, IF: 4.926**] Marusich E, **Mohamed H**, Afanasev Y, Leonov S. Fatty acids from *Hermetia illucens* larvae fat inhibit the proliferation and growth of actual phytopathogens// *Microorganisms*, 2020 Sep 16; 8(9):1423. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091423>
4. **Mohamed. H**, Marusich. E, Leonov. S. Cascade extraction of Black soldier fly larvae fat enriched the antibacterial activities against fish pathogens *A. hydrophila* and *A. salmonicida*, 64th Conference, MIPT, ISBN 978-5-7417-0758-6. P: 84-85, 2021. https://mipt.ru/priority2030/info/64%20%D0%BD%D0%B0%D1%83%D1%87%20%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D1%84%20%D0%A4%D0%91%D0%9C%D0%A4_1.pdf
5. Marusich E, **Mohamed H**, Ivanov G, Leonov S. Discovery of antimicrobial activity of natural products from Black soldier *Hermetia illucens* for agricultural protection. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, Vol. (84):2, P: 138-141, 2019. https://www.researchgate.net/publication/360450010_Discovery_of_antimicrobial_activity_of_natural_products_from_Black_soldier_fly_larvae_for_agricultural_protection
6. **Mohamed. H**, Marusich. E, Afanasev. Y, E, Bendik. I, Leonov. S. Active compounds extracted from *Hermetia illucens* larvae fat inhibit phytopathogenic bacteria, *Biological and medical physics*, MIPT, ISBN 978-5-7417-0758-6. P: 76-78, 2020. <https://mipt.ru/priority2030/%D0%A4%D0%91%D0%9C%D0%A4%20%D0%A4%D0%98%D0%9D%D0%90%D0%9B.pdf>

The results of implemented work were presented and discussed at the following international scientific conferences:

1. **Mohamed, H.**; Marusich, E.; Leonov, S. Antimicrobial activity of extract from *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) larvae against multi drug-resistant (MDR) human pathogenic bacteria//, in proceedings of the 1st international electronic conference on antibiotics—The equal power of antibiotics and antimicrobial resistance (Basel, Switzerland, 8–17 May 2021).
2. **H. Mohamed**, E. Marusich and S. Leonov. Free fatty acids and it's derivatives isolated from *Hermetia illucens* larvae fat shows antimicrobial efficacy against gram negative phytopathogenic

- bacteria. International webinar on mass spectrometry and separation techniques (Kington, UK, 06-03-2021).
3. **Mohamed. H.** Breaking the wall of multidrug resistant bacteria, Falling Walls Lab, Moscow, Skoltech Institute of Science and Technology (Moscow, Russia 01-10-2020).
 4. К. Семейская, **Х. Мохамед**, Р-Л. Заранайна, Ю. Афанасьев, И. Бендик, Е. Марусич, С. Леонов, Универсальность метода экстракции жирных кислот из жира личинки мухи «Черная львинка», подтвержденная методом газо-жидкостной хроматографии (Москва, Россия, 29.11.2021- 03.12.2022).
 5. The Future Applications of bacteriophages conference in Egypt (Cairo, Egypt, 12, 13-03-2021).
 6. Wasson-ECE "Technical Advances in Process GC-MS". (Colorado, USA, 08-03-2021).
 7. Molecule design | and application of chemical probe (Basel, Switzerland, 11-03-2021).
 8. Catalysts Webinar | CO₂ Valorization and Conversion into Value-Added Chemicals (Basel, Switzerland, 17-03-2021).
 9. Quality assurance and data integrity from an auditor's viewpoint (Kent, United Kingdom, 14-07-2021).
 10. Insects as feed and food (Hertfordshire, United Kingdom, 20-22, April 2021).
 11. Keeping your GC-MS happy and healthy: installation, care, and maintenance (Washington, USA, 20-01-2022).

Chapter 1. Literature review

1.1. *Hermetia illucens* fly

1.1.1. *Hermetia illucens* classification and life cycle

Black soldier fly (*Hermetia illucens*) is belonging to the kingdom of *Animalia*, phylum *Arthropoda*, class of *Insecta*, order *Diptera*, and family *Stratiomyidae* [11]. *H. illucens* origin is the Neotropical realm, that geographically including the south of United States and the South America regions, while it has spread all over the world in the recent decades. It has been distributed in the most regions of America, Europe, and Baltic zone of Russia. Moreover, it can also be present in the tropical regions of Africa, Asia, and Australia [12,13]. The life cycle of *H. illucens* includes four phases: egg, larvae, pupa and adult stage, while larva growth contains six instars (Figure 1)

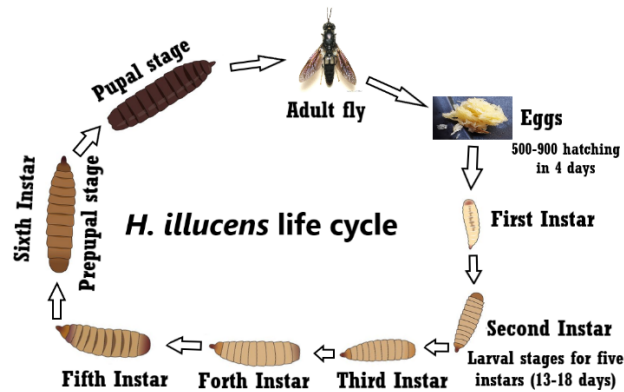


Figure 1. Stages of the life cycle of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) modified from De Smet *et al.* [14].

An adult female lays eggs between 206 and 639 at a time. These eggs are typically loaded on surfaces above or beside the decayed matter such as manure or compost and hatching during four days. Several literatures determined measurements of freshly larvae, which start from one mm in the first phase to become 25 mm in the last instar, and 6 mm in width. They are a dull, whitish colour with a small, projecting head containing chewing mouthparts; further its weight start from 0.22 g to reach to 3.4 g at the end of larval stage [15–17].

H. illucens larvae are able to feed on a wide scope of organic matters; moreover, it can adapt to live on diets with various nutrients [12,18]. The larval stage usually lasts from 18 to 36 days, relying on the food substrates introduced to the larvae, while the prepupal stage lasts only for seven days. The critical environmental conditions in particular the low temperature and food leakage lead to shrinkage the life time of the larval stage, while the pupal stage continuous from one to two weeks [13,19,20]. Adults can live typically from 47 to 73 days when it is reared in optimal conditions, further

provided with enough water and food. In addition, it can survive from eight to ten days depending on the fat reservoir formed in the larval stage supplied with water; also, the adult stage of *H. illucens* can survive for several days without feed or water relying on the fats stored from the larval stage [21].

1.1.2. Importance of *H. illucens* larvae

The larvae of the black soldier fly (BSFL) are able to convert different organic wastes into high valuable compounds; in addition, it can feed on a variety of organic materials such as cow manure, fish offal, brewery by-products, and restaurant waste [22–24]. The chemical composition of *H. illucens* larvae can vary relying on the rearing substrate, while in general BSFL contain around 40% protein and 30% fat on a dry matter basis. Because of their composition, BSFL can be used as an ingredient in feed for different animals such as poultry and fish [25–27]. BSFL could be a more sustainable alternative source of both protein and fat in feeds used in aquaculture and poultry, however, some challenges still found for BSFL to be used as a safe food source edible for human consumption [28].

In comparison with other insects, BSFL have been found containing a high amount of fat, especially in the form of saturated fatty acids (SFA). Furthermore, several studies reported that modification of the nutritional composition of BSFL may be developed and depending on the diet compositions [23,29–31]. Earlier studies suggest that a significant success to modify the fatty acid composition of BSFL, where a high amounts of eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5) and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6) were detected in BSFL bodies when they fed on fish meal and algae [32,33].

H. illucens is a valuable natural source of biologically active compounds exceptionally enriched in the lipids among other insects. The larvae's lipid content is mainly rich in lauric, myristic, palmitic, oleic, capric, linoleic, and other medium-chain fatty acids, where myristic acid has a broad spectrum of antibacterial effects, larvicidal, and repellent activities [30,34,35]. Choi and Jiang [36], reported the activity of hexanedioic acid extracted from BSFL against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The composition of lipids varies depending on the method of larvae processing that can yield various fatty acids (FAs) profiles [31,37]. Lipids and their derivatives comply with antimicrobial characteristics and have been shown to develop antibacterial activity during *in vitro* and *in vivo* studies, potentially leading to finding new natural alternatives beneficial in fisheries units [38]. The potential of *H. illucens* in insect farming for biodiesel yield and insect meal with high nutritive qualities for fish farming and pet food. BSF is able to live in adverse environments, indicating that BSF has an innate immune system that can produce various substances, such as peptides, which can protect them from bacteria, fungi, and viruses. Recently, a skincare product combined with sterilized BSF oil in their formulation was patented. Using alternative solvents to extract oil with enhanced functional properties

from insect biomasses can lead to more innovations and its incorporation in cosmetic and therapeutic formulations [39–41].

1.1.3. Effect of rearing substrate on BSFL fatty acids composition

H. illucens shows a high lipid content (up to 500 g/kg), but the composition of its fatty acid is not always edible for animal and human consumption, and health care use [25,42–44]. It's because of low amounts of monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids and high amounts of saturated ones (SFA) composition of larvae lipids [25,27,37,45,46].

The lipid content after dehydrating *H. illucens* larvae reduced to 35%. The fat content strongly depends on insect stage and generally the amounts decrease during its lifecycle from pupa to adult [47,48]. Several studies have demonstrated that saturated fatty acids is the main group of fatty acids in larvae of *H. illucens*, where lauric acid (C12:0) is the most abundant, followed by palmitic (C16:0) and oleic acid (C18:1 n-9) [23,29,38,49,50]. Barroso *et al.* [29] and Liland *et al.* [32] detected high percentages (12–24%) of linoleic acid (C18:2) in larvae, when fed diets include fish meal and chicken feed, or wheat and brown algae, while Ewald *et al.* [51] estimated low levels of linoleic acid (C18:2), which is found to be ranged from 3% to 13%. There are great similarities in composition between the fatty acids of the larvae and the substrate, where palmitic, oleic and linoleic acid are the most common fatty acids found in the substrates, in the range 8–32%, 6–42% and 4–36%, respectively. In addition, these fatty acids are some of the most common fatty acids present in plant and animal tissues [49,52].

Some fatty acids, such as lauric acid (C12:0) can be synthesized by larvae without corresponding to those found in diets of BSFL, besides they are found in high percentages (13–52%) in the larval bodies compared to low levels (0-1%) detected in substrates [23,49]. Those authors also suggest that the larvae can synthesise the lauric acid from the carbohydrates in the substrate, so growing BSFL on bread (79% of carbohydrates) produce high levels of lauric acid (28%). Furthermore, a significant positive correlation is found between larval weight and percentage of lauric acid (C12:0) and total SFA in the larvae, this can suggest that these fatty acids accumulate and increase when the larvae gain weight and last to the final stages [53].

The high content of SFA can differentiate BSFL from other insect larvae. Since adult BSF do not feed, so the fatty acids in the larvae can store energy for this later life stage, this energy can be stored in the form of SFA because they are less subject to oxidation than unsaturated fatty acids [34,45]. Most insect species have been found to synthesise myristic (C14:0), palmitic (C16:0) and stearic acid (C18:0) *de novo*, and possess the enzymes required for production of myristoleic (C14:1), palmitoleic (C16:1) and oleic acid (C18:1 n-9) [54,55]. However, BSFL are not able to synthesise vaccenic acid, which was detected in low levels (0.8–1.5%) [51].

BSFL are not able to synthesise PUFA, while linoleic acid (C18:2) and α -linolenic acid (ALA; C18:3), eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5) and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6), which has been found in larvae are most probably originated from the substrate [32]. Tvrzicka *et al.* [56] has stated that the enzymes required for production of linoleic acid and ALA (the precursor for EPA and DHA) have been found investigated mainly in plants and marine algae. Some insects, e.g. crickets and cockroaches, are capable of producing linoleic acid *de novo*, while BSFL are disable to produce like these fatty acids [57,58]. The percentages of EPA and DHA in the larvae are depending mainly on their amount in the diet, while these fatty acids are found to decrease as the larvae grew [32], on the other hand Liu *et al.* [53] showed a decrease in unsaturated fatty acids over time as BSFL grew older. The decrease in EPA and DHA is most likely because lauric acid and SFA increase at a higher rate as BSFL grow. This suggests that production of BSFL with high levels of EPA and DHA would result in less efficient utilisation and higher waste of these fatty acids. There seems to be a difference in retention between EPA and DHA, where it is possible that there are mechanisms in BSFL that favour incorporation of EPA over DHA, as suggested by Barroso *et al.* [29]. Omega-3 fatty acids of PUFA amounts increase in larvae bodies, when BSFL are rearing on a substrate with a high level of these fatty acids [36,50].

The crude fat content seems to be mostly related to the percentage of identified fatty acids in the larvae. This suggests that the fraction termed crude fat in the larvae mainly consists of fatty acids. Besides stage of larval development, it also seems that the carbohydrate content of the diet affects the crude fat content of the larvae. Spranghers *et al.* [18] found a strong correlation between the crude fat of prepupae and non-fibrous carbohydrate content in the substrate. This could explain why the larvae fed bread were so high in fat. Moreover, Li *et al.* [52] found increasing amount of lipids in BSFL on adding high levels of glucose and xylose to the diet. There are two different factors were found to affect the fatty acid composition of the BSFL: the fatty acid composition of the substrate and the larval weight. Both of these two factors are connecting with the substrate, since the larval growth is affected by substrate properties [23]. This can pave the way to engineer the fatty acid profile of the BSFL, by substrate selection and BSFL harvesting time.

The quality of lipids from *H. illucens* larvae is high and matches the quality of products from other animal and herbal sources, e.g. palm (kernel) oil. In contrast to the amino acid pattern, the lipid composition can be altered by different larval diets. Specific larval diets result in a lipid composition (based on the carbon chain length) which resembles the composition of palm oil and palm kernel oil. By adding 30% of frying fat to the larval diet, palmitic and oleic acid fractions raised, while the linoleic acid content reduced significantly. Depending on the intended purpose (animal feed or industrial use), it is possible to design the desired larval fatty acid composition. The high content of lauric acid (up to 50%), a raw material for many products in the cleaning and detergent industry, is remarkable [59].

The sustainable exploitation of natural resources can be improved if integrated solutions are employed to tackle the problems of overproduction, disposal of solid organic waste and growing demand for natural raw materials. Natural bioactive compounds have been found in nature from various sources like plants, animals and different types of microorganisms [60]. Insect mass cultures have become available in recent years as a source for proteins and lipids and are currently considered as promising alternatives. There is a sound rationale for this, since insects are highly efficient waste bioconverters, induce a low environmental impact, since they emit less climate-damaging greenhouse gases and consume less water, and the risk of zoonosis is reduced. Furthermore, they can be fed with organic waste from various sources and can be reared on small surfaces, therefore, making large scale industrial breeding possible [61,62]. In this context, the rearing of *H. illucens* larvae has motivated great interest and applications in several sectors that are already envisioned, especially due to their nutritional value.

1.1.4. Effect of extraction procedures on the fatty acid composition of *H. illucens* larvae

The lipid extraction and fractionation processes require a suitable organic solvents and techniques, which are not used in the purification of water-soluble molecules such as proteins and carbohydrates. Complex lipid mixtures in non-polar solvents can be separated based on the polarity and solubility [63,64]. Lipids that contain fatty acids bind with ester or amide bonds can be hydrolysed with some catalysis such as acids, alkalis, and hydrolytic enzymes. Organic solvents like ether, chloroform and benzene are able to extract neutral lipids such as triacylglycerol, pigments, and waxes, while polar organic solvents such as methanol and ethanol can easily extract membrane lipids. These polar ones can reduce the hydrophobic interactions and weaken the hydrogen bonds and the electrostatic interactions that bound lipids to membrane proteins [65]. There are several steps to extract lipids such as sample reduction, hydrolysis, homogenization with organic solvent, separation of the organic and aqueous phase, removal of contaminants, and finally, drying of the extract to remove the organic solvent. Many standard procedures are necessary for the extraction of different types of lipids because each matrix has different characteristics [66,67].

The first aspect in the lipid extraction method is the size of the sample, where the small particle size increases the surface of the extracted matrix and give more chance to contact with the organic solvent, and raising the extracted yield. The diethyl ether or hexane are not effective in the lipid extraction process, in addition, using the water alone as solvent is not preferable since it requires higher costs, as the solute separation requires a lot of energy when water is used alone. The common treatment is acid or basic hydrolysis, where it assists the lipid to be separated easily from proteins or carbohydrates and breakdown the emulsified fats [61].

The selection of solvent type and the extraction procedure are depending on the chemical structure of the sample and the type of lipid required to be extracted. The solvent should be featured with the high solubility of lipid compounds. The solvent must easily penetrate the sample and has a low boiling point to be easily evaporated. The most common solvents used in lipid extraction or solubility are alcohols (methanol, ethanol, and n-butanol), acetonitrile, acetone, halogenated hydrocarbons (chloroform, dichloromethane), ethers, hydrocarbons (benzene, hexane), or a mixture of them. There are many developed traditional lipid extraction methods that include Folch method, Thermal proteome profiling, Bligh and Dyer method, Matyash method, Supercritical fluid extraction method and the Soxhlet method [62]. The industrial extraction of fats from fresh or dried larvae follows different methodologies [68,69].

The BSFL dried biomass is subjected to mechanical pressing to obtain fat and partially defatted meals, which can occur at 100 °C and this process, is typically used in oil extractions of nuts and seeds. During the process, the fat is squeezed out of larvae and a press cake shape is produced. There are two important different methods for fractioning BSFL, which include dry processing and wet processing using a screw press, where the first one involves a drying process of BSFL before pressing, while in the second method, fresh BSFL are directly pressed [70,71].

During the sequential extraction processes of the *H. illucens* larvae fat, many chemical reactions occur between solvent and matrix compounds. The physical and chemical properties of lipids depending on many factors such as the composition of their fatty acids, the length and saturation degree of the carbonic chain, and their melting points. Thermal hydrolysis takes place mainly within the oil phase rather than on the water-oil interface [67].

Free fatty acids (FFAs) liberate from BSFL fat including three steps such as hydrolysis, sonication, and homogenization under the condition of slow hydrochloric acid catalysis. Furthermore, the acid catalysis in water promoted the hydrolysis reaction in the sequential extraction [72].

1.1.5. Dispersive systems formation through *H. illucens* larvae fat extraction

Oils and fats contain triglycerides, which typically compose of glycerol and saturated and unsaturated fatty acid. Physical properties of commercial fats are mostly depend on the fatty acids and triacylglycerol compositions [73,74]. The type of fatty acid in each position profoundly influences the physical behaviour of fat and oil, where the relative proportions of every triacylglycerol in fat and oil are pivotal to their overall behaviour and stability [70]. Fats are melted at temperature (22-40 °C) in the presence of acidic-water-methanol solution, where HCl acid hydrolyse the dispersive fats to produce emulsion of SFAs and USFAs. The formed emulsion of colloidal dispersive systems consists of two immiscible liquid phases, where the dispersed phase (oil layer) present at the upper phase, while aqueous

phase (aqueous layer) contains the liberated FFAs and glycerol. The usual mechanisms leading to physical instability of emulsions includes creaming, sedimentation, flocculation, coalescence, or Ostwald ripening [71]. Hydrolysis is more desirable in oil with short USFAs, such as cis-oleic acid, than oil with long SFAs, like stearic, myristic, and lauric acid because of short USFAs are more soluble in water than long saturated fatty acids. The esterification implemented *via* methanol using HCl acts as catalyst, which accelerate the reaction between the solvent and oil to produce glycerol as a by-product along with FFAs. The behaviour of different lipids in such systems was defined as the partition ratio (micellar/emulsified oil phase). Partition of fatty acids was found to be strongly dependent on the chain length of the fatty acid and the pH of the dispersion. Oil hydrolysis increases with the long time intact between the two immiscible dispersive systems and the large amount of water [67]. Sequential extraction of the same biomass of oil enhanced and enriched the amount of FFAs (oleic acid) and glycerol which, align with the interesterification process, which enhanced the palmitic acid amount increase and prevents the *trans*-isomers formation [70]. The dispersive systems, containing fatty acids and various types of glycerides with improved physicochemical properties and desirable functionality, can be applied and utilized as antibacterial agents, cosmetic, and pharmaceutical emulsions.

1.1.6. Classification of lipids and fatty acids

Lipids are essential organic molecules responsible for various functions of the cell membrane such as signalling, compartmentalization, trafficking, and regulation the vital function of most proteins anchored on the membrane or located outside membrane of the cell [75]. Antimicrobial lipids are classified based on their chain lengths and degrees of unsaturation. Lipids can be classified into eight categories including: fatty acids, glycerolipids, e.g., triacylglycerols (TAGs), glycerophospholipids (GPLs), sphingolipids, sterol lipids, phenol lipids, saccharolipids, and polyketides. GPLs are known as phospholipids, TAGs, and sterols are the most abundant type found in plants and animals [73]. The classification of lipids demonstrated in Figure 2.

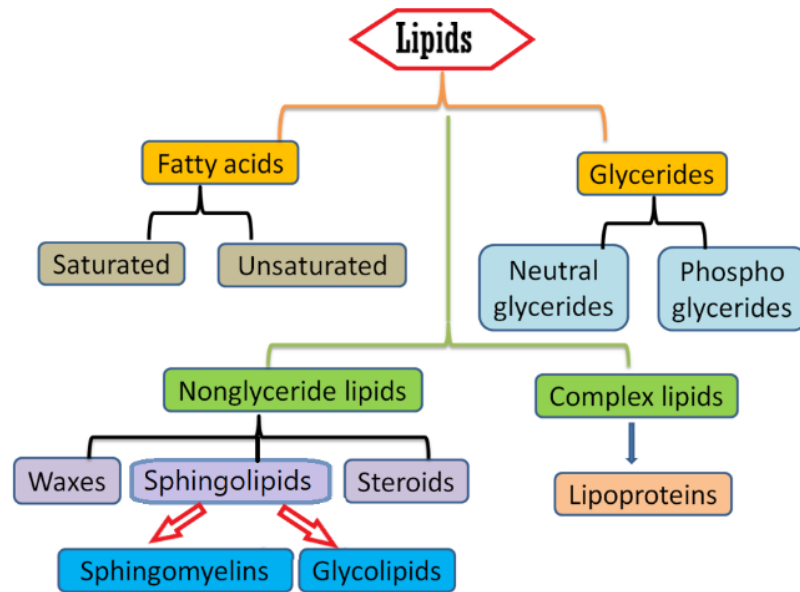


Figure 2. Lipids classification.

Fatty acids are the most common essential biomolecules in different biological systems and have many important biological functions, including the regulation of the cell membranes functions and the activity of enzymes inside of the cell. Fatty acids are carboxylic acids contain saturated or unsaturated aliphatic hydrocarbon chains. They can be classified into four groups as following: (1) short-chain fatty acids ($< C_6$), (2) medium-chain fatty acids (C_6-C_{12}), (3) long-chain fatty acids ($C_{13}-C_{21}$), and (4) very long-chain fatty acids ($\geq C_{22}$), based on the chain length. In addition, fatty acids may have various numbers of double bonds located in different positions in their aliphatic chain, which can form a large numbers of isomeric fatty acids families, e.g., geometric isomers and structural isomers. Fatty acids can be existed as free fatty acid (FFA) forms in biological systems, however they can be presented in bound forms, such as cholesterol and phospholipids, so the total fatty acids include FFAs and bound fatty acids [74]. The main fatty acids in BSFL presented in Figure 3.

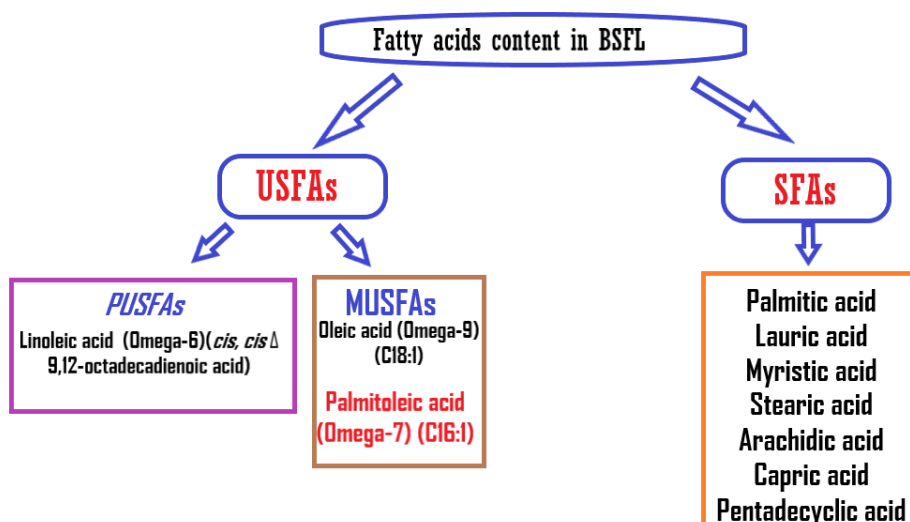


Figure 3. The most abundant fatty acids biomolecules in *H. illucens* larvae fat.

1.2. Antibiotics

1.2.1. Antibiotics as antibacterial agents

Antibiotics are defined as a type of antimicrobial substances active against microorganisms. The main functions of antibacterial agent are fighting against bacterial infections and treatment with antibiotics is employed widely for elimination of such infections. They may either inhibit (bacteriostatic) or kill (lethal) the bacterial growth. A few number of antibiotics have antiprotozoal activity [76,77]. The discovery of antibiotics has drastically changed modern medicine and extended the human lifespan. Antibiotics are the most important class of pharmaceuticals and are one of the most effective medical inventions of the twentieth century. They are undeniably grace to human society to fight against bacteria, saving millions of lives [78], where bacteria are the most outstanding example in terms of morbidity and mortality. The importance of antibiotics have allowed the development of numerous fields of medical practices such as surgical operations and immunosuppressive therapies that based on antibiotic prophylaxis, and the potential to manage infectious complications, antimicrobial resistance (AMR), which represents a significant challenge to all healthcare systems worldwide [79]. The worrying image is that by 2050, increasing in the mortality to be 50 million per year because of an increase in the number of antibiotic resistant bacteria, and this will cost of \$100 trillion USD globally [80].

1.2.2. Antibiotic's resistance

Antibiotic resistance is the leading global health concern to date. The abuse of antibiotics in the medical, veterinary and agricultural aspects, which including the inadequate prescribing of antibiotics, their overuse in the livestock sector, and deficient hygiene practices in hospital, all contribute to the rise of antimicrobial resistance (AMR). AMR points to bacteria and other microorganisms capacity, which withstand the effect of an antibiotic to which they were previously susceptible, allowing germs to survive and thrive [81]. Resistant bacteria strains display several mechanisms to combat antibiotics and to understand the mechanisms by which bacteria withstand antibiotics will be important to solve the crisis. Bacteria have been developed various efficient strategies to block the action of antibiotics, usually is leading to no challenge to treat infectious diseases caused by resistant bacteria strains. It is well confirmed that bacteria depend on various physiological and biochemical mechanisms to induce resistance [76]. It is obvious that the number of infections induced by multidrug-resistant (MDR) bacteria is increasing globally, and the menace of untreatable infections have been revealed since the onset of the 21st century [77]. AMR has a major source of concern over the years, as it takes short time to establish resistance against the antibiotic, and about more than 70% of pathogenic bacteria transformed to be resistant to at least one antibiotic [82].

1.2.3. Reasons of antibiotic's resistance

Microorganisms, such as bacteria are living organisms, which their main goal of life is to grow, replicate, survive, and diffuse as rapidly as possible. As a result, microbes adapt to their surroundings and spread in ways that ensure their continual existence [83]. If something blocks their growth, such as antimicrobial agent, the genetic modifications may occur leading to bacterial resistance that allowing them to survive [84]. It is the natural process of bacteria to evolve drug resistance; however, several parameters remain responsible for the antibiotic resistance. This involves genetic mutation, genetic material transfer, selective pressure, inaccurate diagnosis, inappropriate prescription of antibiotics, self-medication, inadequate and overuse of antibiotics, poor hospital environment, extensive use in agriculture, and availability of few new antibiotics [85]. Figure 4 illustrates the expected mechanistic of resistance induced by bacteria against antibiotics [85].

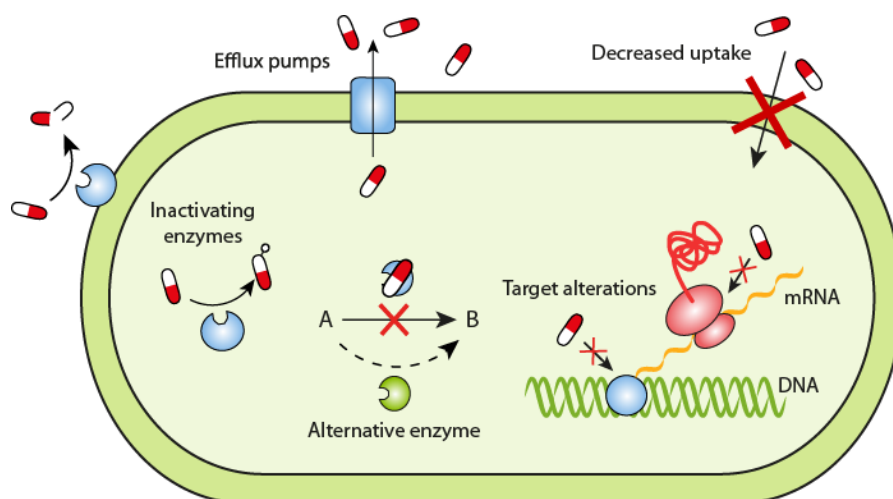


Figure 4. Antibiotic resistance mechanisms developed from Uddin *et al.* [85].

1.2.4. Mechanisms of antibiotic's resistance

Natural and acquired resistances to antibiotics represent the two types of antibiotic resistance. Normal resistance is found to be innate, which is often expressed in the organisms, or mediated, whereas the genes are normally existed on the bacterial genome, but they are only stimulated to resistance levels after treatment with the target antibiotic [86]. On the other hand, acquired resistance may be occurred, when the bacteria acquiring genetic material via translation, conjugation, or transposition, or mutations in its own chromosomal DNA [87,88]. AMR mechanisms may be classified into four categories including, drug uptake limitation; drug target modulation; drug inhibition; and drug efflux [89]. Based on the structural differences and others, Gram-negative bacteria can use all four mechanisms, while Gram-positive bacterial cell walls have not lipopolysaccharides in the outer membrane, thus they rarely to use limited drug uptake or drug efflux mechanisms [84]. Biofilm formation is another mechanism, which helps in the colonization of bacteria, further the matrix of biofilm involves polysaccharides, proteins, and DNA, making antimicrobial agents difficult to enter the bacteria and thereby providing extensive defences [90,91].

These various categories of mechanisms of resistance can be explained with more details as following. Gram-negative bacteria are intrinsically less permeable to certain antibiotics than Gram-positive bacteria, owing their outer membrane creates a permeability shield due to the existence of a lipopolysaccharide layer. The fact that glycopeptide antibiotics e.g., vancomycin is not effective against Gram-negative bacteria because of the lack of penetration through the outer membrane that is a prime illustration of the efficiency of this natural barrier [87].

Many antibiotics are actively extruded out of the cell by bacterial efflux pumps, which are pioneering contributors to Gram-negative bacteria's intrinsic resistance. Efflux pumps are resulting in different forms of most bacteria. Efflux pumps can be divided into five primary families based on its structure and energy supply, including ATP-binding cassette, small multidrug resistance, multidrug and toxic compound extrusion, and resistance-nodulation-cell division family [86]. Tetracycline resistance is an example of efflux-mediated resistance, in which *Tet* efflux pumps use proton exchange as a source of energy to eject tetracycline outside of the bacterial cell [88].

Bacteria inactivate antibiotics by one of the two ways via degradation the drug, or chemical alteration of the drug [87]. In addition, bacteria may provoke enzymes that can bind to different chemical groups of the target drugs, thus antibiotic can not connect or reach to its target in the bacterial cell. Transport of some groups such as acetyl, phosphoryl, and adenylyl to the compound is the most important method of drug inactivation by chemical group transfer. Acetylation is the most likely used mechanism in different antibiotics such as aminoglycosides, chloramphenicol, streptogramins, and fluoroquinolones [89,92].

The β -lactam medicines, such as cephalosporin and penicillin, are the most commonly used antimicrobial agents. The central structure of this drug class has a four-sided β -lactam loop, which is armed among all members. The activity of β -lactamase enzyme degrades the β -lactam loop, which is the key mechanism of β -lactam resistance; therefor the β -lactamases hydrolyse β -lactam ring formation via disrupting its binding to penicillin-binding proteins (PBPs) [90].

The modification of the antibiotic's target is a prevalent mechanism by which bacteria induce resistance against antibiotics. Changes in the arrangement of PBPs are one of the specific mechanisms of resistance developed against β -lactam drugs. The amount of drug that can bind to the target is influenced by changes in the number or amount of PBPs [93,94]. A structural modification e.g. the development of the *mecA* gene in *S. aureus* bacteria will reduce or completely block drug binding with its target [91].

1.3. Fatty acids as natural bioactive substances

1.3.1. Spectrum of antibacterial potency of fatty acids

Antimicrobial lipids, especially fatty acids and monoglycerides, are promising antibacterial compounds that impair bacterial cell membranes, causing a wide range of inhibitory effects [95]. Antimicrobial lipids, which disrupt and damage the bacterial cell wall or membrane, are attractive candidates to be the next-generation antibacterial agents for treating several bacterial diseases, and alternatives for antibiotics in several aspects. Distinctive attention is entice to two classes of antimicrobial lipid, including fatty acids [96] and monoglycerides which yield from esterification of the

fatty acid and glycerol molecule. These two classes of antimicrobial lipid were sounded, paid more attention due to the pioneering studies, which focused on the antibacterial efficacy of fatty acids and different chain lengths of monoglycerides [92,94,97,98]. Lauric acid (LA) with 12 carbon-long chain has the most potent activity to kill the Gram-positive bacteria; therefore, its derivative glycerol monolaurate (GML) displayed even stronger inhibitory effect than LA. Food and Drug Administration (FDA) reported that both LA and GML are safe for use and present in high amount in various organisms. These efforts exerted by researchers led to wide and fast exploration of LA and GML to be applicable as anti-infective drugs in many fields as topics in agriculture and cosmetics [99–101]. In addition, capric acid, which possesses a 10 carbon-long chain, and its derivative, monocaprin, have also received attention, and reported to inactivate common mastitis pathogens, including *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* [102]. Earlier studies have been conducted to empirically test the antibacterial properties of antimicrobial lipids, explaining how the physicochemical properties of antimicrobial lipids influence or react with the biological activities, and this remains promising goal in many respects [98,103].

To date, the MIC considers the most important among primary means used to assess the potency of antimicrobial lipids, further evaluate how treatment affects bacterial cell growth. The MIC of the tested compound is identified as the drug concentration at which no visible bacterial growth occurs. While such information are specific to the scope and potency of an antimicrobial lipid, but it does not interpret the mechanism of action, so there is a growing interest to understand how these antimicrobial lipids damage and impaired bacterial cell membranes. Many literatures have highlighted that antimicrobial lipids act as bacteriostatic (growth-inhibitors) or bactericidal (killing) agents based on the drug concentration, type of bacteria strain and different environmental factors [96,104]. Electron microscopy techniques are promising tools to observe directly the morphological alterations happened in bacterial cell membranes, furthermore utilized to image bacterial specimens after exposing to antimicrobial lipids [92,105]. To visualize membrane damage, high concentrations of antimicrobial lipid in the range (5–10 mM) are used, therefore bacterial cells can be examined only after treatment and sample fixation. Broadly, it is a challenge to clarify and resolve the interaction kinetics through the molecular-level when working with complex compounds in biological samples such as the bacterial cell, thereby this motivates to search for developing of new model systems.

Antimicrobial lipids are known as single-chain amphiphiles lipid, which are able to interact with bacterial cell membranes and cause bacterial inhibition. Fatty acids are a broadly studied type of antimicrobial lipid, and are almost found to be saturated or unsaturated hydrocarbon chain with carboxylic acid group on one end. As such, the hydrocarbon chain in fatty acids forming the hydrophobic part while the carboxylic acid group is hydrophilic, so fatty acids are amphipathic molecules [95]. In

addition, fatty acids derivatives have been documented to have antibacterial activity, with one outstanding class being monoglycerides that formed of fatty acid bounded with a glycerol molecule via an ester bond. There are synthetic versions of fatty acid derivatives such as related compounds with ether bonds, which can render such molecules impregnable to bacterial lipases. Compared these synthetic compounds with fatty acids, monoglycerides distinct with non-ionisable functional groups across relevant pH conditions, so they are non-ionic molecules with neutral electrical charge properties [102]. Representative FAs with different molecular structures presented in Figure 5.

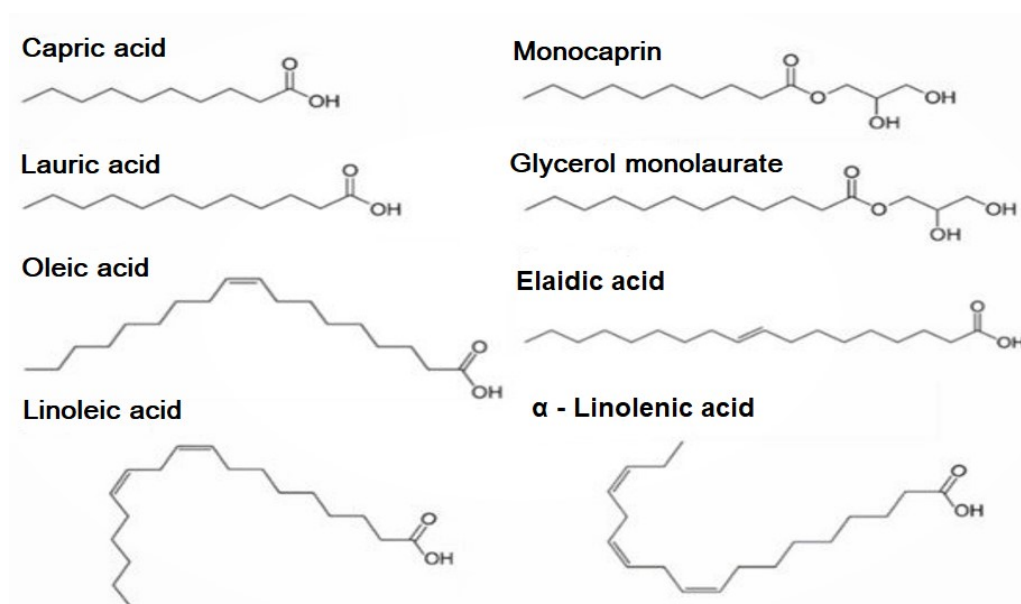


Figure 5. Chemical structures of fatty acids and monoglycerides. Saturated fatty acids capric acid (C10:0), LA (C12:0). monoglycerides; monocaprin (GM C10:0), glycerol monolaurate (GM C12:0). Unsaturated fatty acids; oleic acid (C18:1), elaidic acid (*trans*-C18:1). Polyunsaturated fatty acids; linoleic acid (C18:2), linolenic acid (C18:3) [95].

In general, fatty acids typically a specific even number of carbon atoms ranged between 4 and 28, while other versions with odd-numbered are possible synthetically produced. The short-chain fatty acids that are less than 8 carbon atoms long, while those group with greater than 12 carbon atoms known as long-chain fatty acids and medium-chain fatty acids known to have carbon atoms between 8 and 12 [96,106]. Another important factor is the number of degrees of unsaturation, where carbon atoms of saturated fatty acids are linked by single covalent bonds, while unsaturated fatty acids contain one or more double bonds in the carbon backbone. Definitely, when fatty acids having more than one double bond are defined as polyunsaturated fatty acids. The number and the orientation (*cis*- or *trans*-) of double bonds can change and influence significantly on the different physicochemical properties of fatty acids, even among compounds, which have the same length of hydrocarbon chain. Thus, classifying fatty acids and their derivatives is a crucial part of investigating trends in the antimicrobial activity with regard to

molecular structure and shape. To date, extensive studies have been conducted on unsaturated fatty acids with medium or long chains, which typically showed high efficacy against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria. Many studies also have been focused on assessing the antibacterial properties in the presence of compounds with double bonds [107,108].

Chen *et al.* [109] determined the potency of myristic acid against *Listeria monocytogenes*, which causes a series of food-borne diseases. Notably, fatty acids and monoglycerides, LA, linolenic acid, and GML showed a great bactericidal activity, when they were cultured in brain heart infusion broth media at pH 5. Interestingly, the bactericidal activity of several fatty acids depending on solution pH, where the activity increased at pH 5 compared to pH 6, while the monoglyceride activity was not influenced by solution pH across this range. Thus, this hypothesis is consistent with the ionisable head group of fatty acids while monoglycerides are nonionic molecules [95,110,111].

Helicobacter pylori is another target bacterium that is susceptible to fatty acids, this pathogen is a Gram-negative bacterium that can cause severe infection in the stomach or duodenum leading to many diseases like gastric ulcers, chronic gastritis, and stomach cancer. Several studies documented that fatty acids and their derivatives inhibited and eradicated *H. pylori* *in vitro* and *in vivo* [103,112–114]. Similarly, findings of LA and GML implemented by Sun *et al.*, [108] against *H. pylori*, where the activity of such selected unsaturated fatty acids were assessed along with a range of saturated fatty acids (4–16 carbon chains) and monoglycerides (12–16 carbon chains).

LA completely eradicated *H. pylori* at minimum lethal concentration (MBC) of 1 mM, while GML showed higher activity than LA with MBC 0.5 mM. Additionally, myristoleic (C14:1) and linolenic acid unsaturated fatty, have the most potent activity among other unsaturated fatty acids against *H. pylori* [108]. Furthermore, Bergsson *et al.* [115], also, evaluated the inhibitory activity a wide range of fatty acids and their monoglycerides against Gram-negative bacteria, including *H. pylori*. Interestingly, the fatty acids with hydrocarbon chains length ranged from 10-to16 carbon atoms exhibited inhibition of *H. pylori* at 10 mM concentration, while no significant activity observed against *Salmonella* species and *Escherichia coli*. Several additional studies carried out in order to evaluate the antibacterial properties of selected antimicrobial lipids against different bacterial strains, and it was indicated that monocaprin (MG C10:0) showed the highest bactericidal activity against *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Additional studies have been conducted to investigate the impact of fatty acids hydrocarbon chain ranged from 2 to 18 carbon atom on *E. coli* as a Gram-negative bacteria and *Salmonella* species [116,117], and they highlighted that caprylic acid (C8:0) has exhibited high antibacterial activity against these bacteria. Also, caprylic acid and its monoglyceride, monocaprylate, have shown appreciable antibacterial potency against fish pathogenic bacteria *Edwardsiella* spp. [118]. Of particular note, caprylic acid and monocaprylate exhibited a

reasonable activity against the most important foodborne pathogens including, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* species, and *L. monocytogenes* [119,120].

Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) are responsible for causing skin infection, including acute bacterial skin and skin structure infections were inhibited by saturated fatty acids, where Kitahara *et al.* [121] investigated a wide range of saturated fatty acids against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* MSSA, and resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). LA was found to be the most potent saturated fatty acid against MRSA, while GML showed high activity against *S. aureus*. Additionally, Lin *et al.* [122], reported that GML effectively killed *in vitro* and *in vivo* tested bacteria, further diminished the toxic shock syndrome. Another *in vivo* study conducted by Preuss *et al.* [123], emphasized the antibacterial potency of GML against human pathogenic *S. aureus* infection. Moreover, Nakatsuji *et al.* [99], stated that LA was effective to treat a mouse infected with Gram-positive bacterium, especially *Propionibacterium acnes*. Hence, recently studies have been demonstrated that multiple antimicrobial lipids have a leading antibacterial activity *in vivo* therapeutic potential, and extensive studies carried out to investigate combinations of several antimicrobial lipids with high antibacterial potency against target bacteria to obtain broad-spectrum synergistic effects [124–128].

1.3.2. Mechanisms of antibacterial activity of fatty acids

1.3.2.1. Membrane permeability and cell lysis

The mechanisms of antibacterial activity of fatty acids and their derivatives specifically monoglycerides have been examined using various experimental methods. To identify these approaches, these antimicrobial agents should mainly target bacterial cell membranes and disrupt the pivotal processes involved in cellular protection and function. Fatty acids and monoglycerides have amphipathic properties that are able to disturb the bacterial cell membrane, leading to interfering sets of biophysical phenomena such as membrane impairment and pore formation. In particular, membrane-destabilizing activity increases the cell permeability and cell lysis, leading to inhibition of bacterial culture growth (bacteriostatic action) or killing the bacterial cells (bactericidal action) [95,96].

Among essential processes involved in bacterial cell membranes, two important processes including, the chain of electron transport and oxidative phosphorylation, which are important for energy production in bacterial cells. These two processes are interconnected, and fatty acids have the potential to retard the electron transport chain process by connecting with electron carriers or modifying the membrane integrity as well as interfering with oxidative phosphorylation by reducing the membrane potential and proton gradient. Moreover, fatty acids can directly inactivate membrane enzymes especially glucosyltransferase, probably because of the similarity between fatty acids and small molecule

inhibitors in molecular structures [129], therefore the target other membrane-associated proteins [130]. Figure 6 represents a schematic demonstration for the antibacterial mechanism of action of fatty acids and monoglycerides that relate to targeting bacterial cell membranes. The specifics of the mechanistic processes are divided into three aspects depending on the relationship between the following: (1) increase the membrane permeabilisation and cell lysis, (2) impairment of electron transport chain and uncoupling oxidative phosphorylation, and (3) inactivation of membrane enzymes and nutrient uptake.

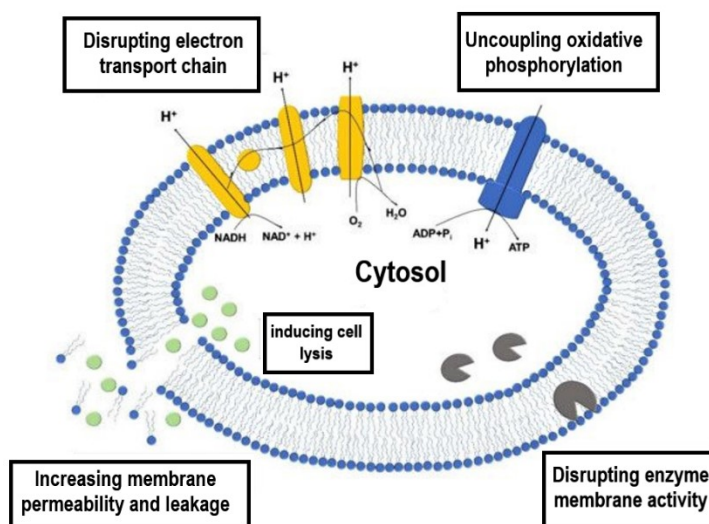


Figure 6. Schematic representation describe the prospective mechanisms of antibacterial activity of fatty acids and monoglycerides modified from Yoon *et al.* [95].

The interaction of antimicrobial fatty acids with bacterial cell membranes can disrupt the membrane and increase membrane permeability, thereby inducing leakage of cytosolic components. In utmost cases, increased permeability and membrane destabilization most likely leading to cell lysis [97]. Cartron *et al.* [131] observed increasing in the membrane permeability, fluidity, and integrity of *S. aureus* cell membranes measured when bacterial cells treated with *cis*-6-hexadecanoic acid. Oleic acid treatment reduced the polarization value, which showed increased membrane fluidity and led to cell death. Similar studies stated that PUFAs acid treatment caused the destruction of *E. coli* cell membranes [132]. Additionally, treatment with monocaprylin caused membrane leakage, which confirmed by measuring the release of cytoplasmic materials at 260 nm, which is related to the bacterial cell membrane leakage. As such, conducted measurements displayed that monocaprylin inhibits the *S. aureus* and *E. coli* bacterial growth by increasing the membrane permeability, which is confirmed via morphological or cell compartments alterations, and cell lysis was visualized [133].

In particular, *cis*-6-hexadecanoic acid inhibited bacterial cell growth via acceleration of membrane permeability, as assessed by monitoring potassium ions efflux and electrical potential of the bacterial

cell transmembrane. Increased in the permeability led to an increase in K^+ efflux and a decrease in the potential of membrane. Beyond biochemical methods, many studies have declared using electron microscopy to examine the membrane-leakage of various bacterial cell types induced by antibacterial fatty acids [115,131]. In most of these studies, treatment with high concentrations of antimicrobial fatty acids is leading to extensive morphological alterations in the bacterial cell membrane [109,131]. In addition, antibacterial monoglycerides inhibited and disrupted the membrane of different bacterial cell types. Regarding direct visualization of cell lysis, Furthermore, myristic acid induces cell lysis of *L. monocytogens*, was visualized by electron microscopy [109].

1.3.2.2. Disrupting electron transport chain and uncoupling oxidative phosphorylation

The electron transport chain is a complex process that composed of electron carriers and produces the energy source (ATP), and is coupled to oxidative phosphorylation by the ATP synthase. The ATP synthase and electron transport chain are both located at the inner membrane of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Electrons are transported from one carrier to another until reaching to oxygen, which is the final electron acceptor [96]. The electron transport process is accompanied by proton (H^+) transfer from the cytosol to outside of the cell, creating a proton gradient across the cytoplasmic membrane and increasing the membrane potential that provides an energy source to produce ATP via ATP synthase. When one of the steps in the electron transport chain and oxidative phosphorylation is damaged, it is difficult for bacterial cells to obtain the sufficient energy for metabolism; this will lead to inhibit the bacterial culture growth, and eventually cell death.

The disruption of the electron transport chain can be determined by measuring oxygen uptake with a Clark type oxygen electrode setup. Following this approach, LA and myristic acids were the most potent antibacterial saturated fatty acids, which are capable of inhibiting the oxygen intake for *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas phaseolicola*, while unsaturated fatty acid linoleic acid was the most effective at much lower concentrations (greater potency) than saturated fatty acids. Moreover, the effect of fatty acid activity performed on *Bacillus subtilis* strain by measuring oxygen uptake and ATP concentrations, and indicated that the interaction of fatty acids with the bacterial cell membrane led to decrease the membrane integrity, oxygen uptake, and reducing ATP levels [95]. To measure the effect of fatty acid treatment directly on electron carrier transport in live bacteria is a challenge, it is worthy of note that Peters *et al.* [134] investigated electron transport process in intact chloroplasts, demonstrating that palmitoleic acid (C16:1) principally inhibited about 90% of the electron transport system photosystem II. Despite the latter study was not performed on bacterial cell membranes; the findings still providing useful information to understand how membrane destabilization caused by antibacterial

fatty acids, further they can induce severe impairments to electron transport carriers, and prohibit biochemical processes.

1.3.2.3. Inhibiting activity of bacterial enzymes

Inhibition of the activity of enzymes associated with membrane is another significant mechanism by which antimicrobial fatty acids disrupt bacterial cell membranes, and there have been several studies explored the effects of fatty acid treatment on certain bacterial cell enzymes. For example, Won *et al.* [129] demonstrated that oleic acid inhibit glucosyltransferase (GTase), which catalyses glucan production in *Streptococcus sobrinus*, finally this leads to bacterial growth inhibition. GTase enzyme is an essential transmembrane protein that is responsible for glucan production in bacterial cells and produced by *Streptococcus mutans* and *Strep. sobrinus*. Significantly, oleic acid, linoleic acid, and arachidonic acid (C20:4) are unsaturated fatty acids exhibit even higher inhibition of GTase activity, while non-significant effect caused by saturated fatty acids. This finding is very important because it supports these antibacterial lipids with different physicochemical properties can have distinct modes of interacting with bacterial cell membranes. Another study also, highlighted that oleic acid can inactivate GTase, this supporting that unsaturated fatty acids have antibacterial activity to inhibit at least in part, membrane-associated enzymes [129].

Additionally, it was declared that fatty acids and their derivatives could disrupt bacterial growth by inactivation fatty acid biosynthesis. Indeed, fatty acids play crucial roles in bacteria because they are precursors of essential cellular materials. Thus, linoleic acid, exhibited antibacterial activity against *S. aureus* by inactivation bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI), which is important in the fatty acid elongation process [135]. Similarly, the activity of medium-chain saturated and unsaturated fatty acids against *S. aureus* was determined related to inhibition of fatty acid synthesis, and these findings stated that, α -linolenic acid was the most effective inhibitors among the tested compounds [136]. To what extent the impacts of antibacterial lipids on bacterial enzymes are still need to be understood broadly, to clarify membrane destabilization processes, while it is obvious that the effects of antimicrobial fatty acids on bacterial membranes can disrupt key enzymatic activities. Within this scope, it is particularly interesting that unsaturated fatty acids influence bacterial enzymes, while saturated fatty acids typically have non-significant effect on the same enzymes. Such findings boost the overall motivation to set up measurement platforms for depicting the mechanism of action and efficacy of antimicrobial lipids acting against phospholipid membranes, and to design correlations with biological activities.

1.3.2.4. Peroxidation and autoxidation

Several studies have suggested that the antibacterial activity of FFAs is due to the action of secondary degradation products of FFAs. These could be developed by peroxidation that yields H_2O_2 and reactive oxygen species [137] or auto-oxidation of unsaturated FFAs that creates oxylipins and short-chain aldehydes, which are effective antibacterial in their own right [138,139].

Of course, the specific mechanisms by which individual FFAs cause bacterial growth inhibition and/or death will depend on FFAs structure, the target bacterium and the sites that the FFA can access. Effective control of bacterial growth and survival might involve multiple mechanisms, each of which might, directly or indirectly, be affected by factors such as pH and temperature. Often it is not clear whether changes in antibacterial activity caused by different pH and temperature conditions is due to alterations in the solubility of the FFA or whether these conditions have greater influence on the physiology, and therefore the susceptibility, of the target bacterium [95,96].

1.4. Fatty acids disrupt pathogenic bacteria biofilms

Bacterial biofilms can be established, when bacteria are organized in aggregates. These biofilms are sessile clusters of bacterial cells that are adhered on biotic or abiotic surfaces, further they consist of a complex matrix composed of extracellular polymeric substances such as polysaccharides, proteins and DNA that surrounding cells. Furthermore, different pathogenic microorganisms often form mixed biofilms, which further enhance tolerance to antimicrobial agents [140]. Biofilms guarantee protection and resistance against external stress, e.g., osmotic stress, desiccation, radiation, the host immune system or toxic biochemicals, e.g., antibiotics [141]. Microbial pathogens organized in biofilms are difficult to be treated owing to their optimal protection. They induce various strategies to sustain high concentrations of antibiotics which, leading to persistent severe infections [142]. However, these phenomena of tolerance against antibiotics can be reversed and the cells can return to be susceptible again to antibiotics after biofilm dispersion and the cells return to the planktonic phase. The dispersed biofilms when combine with the target antibiotic, this will facilitate to control biofilm infections, thus can become an alternative approach for the biofilm treatment [143]. Biofilms established by bacteria and fungi play pivotal roles in antimicrobial resistance and in a various device-related infections.

The antimicrobial activity of various fatty acids with concentrations mostly above 100 $\mu\text{g/mL}$, have been confirmed to be effective against diverse microorganisms [95,144]. However, recently studies declared that fatty acids exhibit antibiofilm and antivirulence activities against bacteria and fungi at concentrations much lower than their MICs [145], and various of fatty acid derivatives are important cell-to-cell signals in various plant-associated bacteria [146]. Short-chain fatty acids disrupt the biofilm

formation of *Streptococcus gordonii* through negative regulation of competence-stimulating peptide signalling pathway [147], also, Kim *et al.* [148] documented that saw palmetto oil, lauric acid and myristic acid can inhibit the biofilm established by multiple microbial species.

Various fatty acids have been reported to inhibit biofilms established by *S. aureus* including, palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), eicosadienoic acids (C20:1) [145,149]. In addition, recent study conducted by Yuyama *et al.* [150] have been stated that linoleic acid shows high efficacy in the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms.

Alpha-haemolysin (Hla) is a prime cytotoxic agent and is mainly related to the biofilm formed by *S. aureus* [151,152], is inhibited by fatty acids, therefore, Hla has been suppressed by saturated and unsaturated fatty acids at high concentrations, which influencing the membrane fluidity in *S. aureus* [153]. Furthermore, the decrease of haemolysin production and membrane fluidity can suggest and clarify the mechanisms of lauric acid and myristic acid to control *S. aureus* biofilm formation.

1.5. Fatty acids fight against most important phytopathogenic bacteria in crops protection

Bacterial phytopathogens are considered the most important causal agents of plant diseases, with a negatively increased economic impact on crop production. Phytopathogens affect all food-producing plants colonizing either their surface or tissues [154]. They cause symptoms such as spots, blights, cankers, tissue rots, and/or hormone imbalances that lead to the plant overgrowth, stunting, root branching, and leaf epinasty [154,155]. Bacterial soft rot caused by pectinolytic *Pectobacterium* species (soft rot *Pectobacteriaceae*) and *Dickeya* species (*Solanum tuberosum*) is one of the major disease of the potato production in many potato-growing regions of the world [156,157].

High genotypic and phenotypic diversity of these bacteria caused disease symptoms on a wide range of host plants. *Pectobacterium* induce tissue maceration or rot symptoms in plants. These pathologies caused by the phytopathogen production of extracellular enzymes degrade cell wall constituents, such as pectate lyases and other pectinases, cellulases, and proteases [158,159]. *Xanthomonas* belongs to gram-negative bacteria that can infect such crops as beans, rice, citrus, and cotton [160]. *Xanthomonas campestris* pv *campestris* invades the vascular system or the mesophylls and cause black rot diseases for cruciferous crops such as mustard, cabbage, broccoli, cauliflower, brussels sprouts, and radish worldwide [161]. *Dickeya solani* and *Pantoea agglomerans* distribute among various broad of host range, many crops ranging from potato to banana, fire blight disease of ornamentals, fruit trees, bushes, the soft rot diseases, and others [162].

Persistent infection increases the levels of morbidity and mortality globally and are an essential cause of plants' recurrent infective diseases. Thus, understanding bacterial survival strategies is an

important step to develop new strategies beneficial for controlling plant diseases. Persister cells consider a big problem spread rapidly, it can be formed under stress conditions to survive, and they are a small fraction of phenotypic variants within an isogenic population that exhibits multidrug resistance without undergoing genetic changes. In addition, they can be described as dormant cells that survive treatment with antimicrobials by inhibition the metabolic functions that are disrupted by these compounds [163]. The presence of resistance and persister cells in phytopathogens might be the reason of robust to eradicate plant diseases, despite the intensive environmental conditions faced by phytopathogens, such as UV radiation, temperature, drought, plant defence responses and antimicrobial compounds [164–166]. In addition, this might also be an essential reason for crop disease outbreaks and recurrence, even with the frequent use of antimicrobial agents and other management methods in the field [167–169].

The one good example of recurrence is in *Xanthomonas* spp, where copper is widely used to control this bacterium, and persister cells are formed under copper stress, allowing regrowth [170]. Moreover, resistance to copper is also observed in the field, leading to a continuously increasing use of copper in the field to control citrus canker, but this infection can recurrent [171,172]. This example can be applied to several plant bacterial diseases, where copper or antibiotics are not capable of killing the systematic bacterial population and infection is recurrent [167,171]. Consequently, it is feasible to say that there is a suitable condition responsible for the appearance of “superphytopathogenic” bacteria similar to the human superbugs. However, in contrast to human pathogenic bacteria, where there are many studies focusing on persister cells, the occurrence of persistence in phytopathogens and studies focusing on this phenomenon in the field are sparse.

However, the control of diseases caused by the pathogens listed above is difficult due to the limited efficacy of existed biological or chemical agents and the resistance to antibiotics long-term overuse [162]. Several developed methods were implemented to eradicate plant bacterial diseases, including chemical control, resistant varieties, and biological control. Chemical control can prevent large-scale losses and spread of diseases in crops, despite these chemicals and antibiotics come with several drawbacks such as, ecotoxicity, bioaccumulation, and adverse effects on nontarget plants, animals, and human.

Exposure to these chemicals especially pesticides, fungicides, etc. is known to cause various types of cancers, respiratory disorders and hormonal imbalances in humans. Furthermore, a high resistance induced by bacteria after exposing to different antibiotics [173]. The combination of some reliable methods was applied to control plant diseases, including mechanical (such as hot water, steam, dry hot air, solar) or UV irradiation treatment, and chemical processing by antibiotics, natural bactericides, or synthetic anti-microbial peptides [156,174]. It is worth stressing that, at present, there are no methods

enable to eradicate post-infection besides the only preventive measures, which are commonly applied to limit or eliminate their further prevalence.

Natural bioactive compounds have been used recently to control phytopathogens, therefore promoting plant growth, such as phenolic, terpenoid, or alkaloid categories [175] as chitin, laminarin, allicin, terpenes, chitosan, naringin, and carrageenans have been used as biopesticides in organic cultivation. Medium-chain fatty acids, including octanoic acid, capric acid, and lauric acid, inhibit various bacterial, fungal, and viral pathogens and have been widely used in human and veterinary medicine [176–179]. Early studies highlighted the possibility of using fatty acid in plant bacterial diseases, for example the combination two *Trichoderma* spp., with a medium–long chain fatty acids mixture was investigated on different vegetable crops in terms of biocontrol, growth promotion, yield and quality improvements. This mixture application reduced *Botrytis cinerea* necrosis by up to 90% compared to the infected control plants. An increasing yield, ranging from 25 to 90%, was recorded on treated tomato, lettuce and kohlrabi compared to untreated plants [180].

Multiple studies reported that different fatty acids have a beneficial interaction with the plant by increasing not only defence responses, but also plant growth vigour. This concurs with other studies, which have shown significant effects of fatty acid mixtures on different crops as reported in several studies [181,182]. In particular, Leyva *et al.* [181] showed an increase in the root dry weight of cucumber and tomato plants after applying a mixture of palmitic and oleic acids. Liu *et al.* [182], stated that mixing of oleic acid and palmitic acid was effective in the treatment of plant diseases

1.6. *H. illucens* larvae utility in aquaculture and veterinary industry

Aquaculture is a food-production sector that permanently grows worldwide. It produced nearly 74 million tons of fish, and approximately 45% of the global production of fish-based food, in 2014. Because of the increasing demand for food protein and the stagnation of wild catch, fish production by aquaculture is expanding, with a growth rate exceeding 8% per year [183]. Aquaculture confronts several problems, including the corruption of natural ecosystems, water contamination, biological pollution, and the emergence of various fish diseases.

The use of antimicrobials in fish farming mirrors the fast aquaculture development worldwide. The intensification of aquaculture to achieve market demands could increase infectious diseases by pathogenic bacteria. Consequently, antimicrobials control emerging infectious diseases, although their use must follow the rules and local regulations of the country where they are explored. Bacterial fish diseases are usually treated with antibiotics which, over time, lead to bacterial resistance [184]. The selection of resistant bacteria is closely associated with antibiotic treatments, the co-selection of

resistance genes, and cross-resistance processes. The aquatic environment (freshwater and marine) can serve as a reservoir of resistant bacteria and genes encoding antimicrobial resistance [185]. Aquaculture is yet another environmental gateway to the development and globalization of antimicrobial resistance. The development and spread of resistant bacteria combined with antimicrobial residues in the environment represent dangerous risks to public health [186]. Resistant bacteria from fish farming are a severe concern because humans can acquire them with handling or food chain, and this represents a public health problem.

Aeromonas spp. are the most common bacteria in fresh or saline habitats frequently associated with severe infections in cultured fish species [187]. The *Aeromonas* genus comprises a group of Gram-negative anaerobic bacteria found in soil and water. Besides, it can be associated to various infectious diseases found in animals and humans [188] classified into two groups: mobile mesophilic (optimal growth between 35 and 37 °C), associated to various human diseases and psychrophilic, non-mobile (optimal growth between 22 and 25 °C), which can infect both fish and reptiles [189].

A. hydrophila is a Gram-negative rod-shaped bacterium is the leading causative agent of *Aeromonas* septicemia known as tail and fin rot. This bacterium causes severe infections for a diverse types of fish; additionally, it can infect some marine fish species [190]. Aeromonads produce different types of toxins, such as cytotoxic enterotoxin, cytotoxic enterotoxin, aerolysin, and hemolysin. They also secrete several extracellular enzymes such as lipase, elastase, gelatinase, protease, and DNase. The secretion system, flagella system, and biofilm components are associated with the potential virulence of *Aeromonas* spp. [191]. The symptoms of these infections include ulcers, abdominal distension, accumulation of fluid, anaemia, and haemorrhaging, resulting in mass mortality in fishes around the world [190]. In farming practices, various methods are applied to reduce the existence of *Aeromonas* spp. infection such as vaccination, water chlorination, and antibiotic chemotherapy. It was reported that the excess use of antibiotics accelerates the emergence of multidrug-resistant strains of *A. hydrophila* in aquaculture habitats [187].

A. salmonicida subsp. *salmonicida* is a non-motile Gram-Negative bacterium that causes furunculosis in salmonid fish. Therefore, it infects zebrafish in the aquatic environment, and it can multiply rapidly within a few hours of the post-infection [192]. Bacteria can be resistant to certain antimicrobials naturally or by horizontal gene transfer [193]. This pathogen can cause haemorrhagic sepsis, ulcerative lesions, pointed bleeding, and death [194].

Multidrug resistance of food-borne bacteria is a paramount public health concern. The overuse of antimicrobials in aquaculture may cause antimicrobial contamination in coastal water environments [195]. The intrinsic resistance of the *Aeromonas* genus to beta-lactams antibiotics is associated with a chromosomal beta-lactamase expression or activation of efflux pumps [196]. Genes that confer

resistance to a broad spectrum of beta-lactams antibiotics were identified in the genus. In particular, almost 10.5% of *Aeromonas* sp., isolated from an estuary, possessed beta-lactamases genes, especially the gene *bla*TEM [197]. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) are encoded on mobile genetic elements, such as plasmids, transposons, and integrons, which also harbour resistance genes to other classes of antimicrobials [198]. Strains producing ESBL can resist treatment and increase the morbidity of diseases associated with bacterial infections. Resistance to at least two classes of antimicrobials observed in 59% of untreated water isolates [199]. Moreover, the presence of the *tet* gene encoding resistance to tetracycline in 10%, and the *bla* gene in approximately 29% of isolates was observed. The *tet* gene found in *Aeromonas* species is considered as a result of strong anthropogenic pressure on aquaculture due to the use of tetracycline as antimicrobial [200]. On the other hand, in Australia, where no antimicrobials are licensed for use in aquaculture, 100% of *Aeromonas* strains isolated from fish carried the *tet* gene [201]. Albeit *Aeromonas* sp. presents typical characteristics of antimicrobial susceptibility, resistance profiles vary between studies because of the specific traits of the strains or selective pressure of the environment [191]. That prompted the necessity of antibiotic resistance profiling of each laboratory strain before comparison with new testing antimicrobials.

The activation of efflux pumps is yet another important factor in the resistance of *Aeromonas* sp. The *Aeromonas hydrophila* efflux ABC (*Ahe*ABC) system, encoded by genes *AheA*, *AheB*, and *AheC* of *A. hydrophila*, is involved in the phenotype of multidrug resistance to cefuroxime, cefoperazone, erythromycin, lincomycin, pristinamycin, minocycline, trimethoprim, fusidic acid, and rifampin [202].

Except for a few strains and the species of *Aeromonas* spp. are described as resistant to ampicillin [203]. These bacteria are also resistant to penicillin and first-generation cephalosporin groups [204,205]. *Aeromonas* spp. can be susceptible to monobactams, carbapenems, third, and fourth generation cephalosporins, aminoglycosides, and fluoroquinolones [39]. Ndi *et al.* [201] reported an increase in the resistance to beta-lactam antimicrobials (penicillins and derivatives, cephalosporins, carbapenems, and monobactams) by the presence of genes that code for the production of beta-lactamases [190]. Recently, the studies of antimicrobial profiles in *Aeromonas* spp. have increased due to the necessity of responsible use of antibiotics [206–208].

Control and treatment of fish bacterial diseases including physical, chemical, and biological treatments. Physical control such as quarantine, vaccination, regulation of temperature, use of recommended stocking densities, filtration and irradiation of inflow water using ultraviolet (UV) light. Additionally, to control *Aeromonas* diseases, multiple routines were followed such as, reducing stress factors including, dissolved oxygen, high temperature, overcrowding, proper diet and maintenance of good water quality, isolation of new fish in quarantine and prompt isolation of sick fish, treating fish with prophylactics such as sodium chloride, acriflavine, copper sulphate and salt [209]. Vaccines and

antibiotics used in aquaculture to treat and control fish pathogens. Vaccination is important, as it is one of the main approaches to prevent and control several diseases in aquaculture. Most vaccines are relying on inhibiting microorganisms and adjuvants delivered through immersion or injection. Prophylactic immunization for bacterial diseases in farmed fish has been attempted with some success against *Yersinia ruckeri* and *A. salmonicida*. However, some successes achieved by vaccine treatment, there are no vaccines available for many pathogens. In addition, the development of new fish vaccines is very expensive and impractical in fish larvae, which are usually more susceptible to disease, and can not induce specific immunity.

To overcome these challenges in aquacultures, antimicrobial drugs used for treatment bacterial fish diseases. Although antibiotics show high selectivity in killing fish bacteria, but several problems appeared such bacterial resistance towards diverse types of antibiotic classes due to the use of antibiotics at low concentration (<MIC). The transition of antimicrobial residues, antimicrobial-resistant bacteria and resistance genes from the aquatic niches to terrestrial livestock and humans led to high risk of wide-spreading drug resistance. Biological control by phage therapy appears as an environmental friendly and effective solution to control pathogenic bacteria in aquacultures, however, only one phage-based product, called BAFADOR®, was approved to control *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp. in aquaculture [3,210].

In summary, control and management of bacterial diseases in aquaculture become more challenging because of many reasons including; (i) faecal contamination in fish farm waters, because of limited medications are licensed for use in fisheries, and many antimicrobial agents are ineffective against endospores and zoospores, leading to treatment failure in the case of infection; (ii) unsuitable environmental conditions, such as high elevated temperatures, salinity variations, decreased in dissolved oxygen, high organic material load, that increase disease outbreaks; (iii) high fish density, which is common practice in farming leading to reduce the infection resistance; (iv) different stages of the fish life cycle, that affect the development of the immune system; (v) uncontrollable use of antibiotics that increases the resistance problem in common pathogenic bacteria and the concern with the antibiotic spread in the environment [210].

Replacement of dietary fish meal with BSFL partially or totally has been successfully demonstrated in various fish species including, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*; Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*; Atlantic salmon, *Salmo salar*; European sea bass, *Dicentrarchus labrax*; hybrid tilapia; marron, *Cherax cainii*; and *Monopterus albus* [211]. Replacement of fish meal by BSFL meal has significant effects on growth, haematology, and skin mucus immunity of Nile tilapia, [212,213].

Livestock farmers generally used antibiotics in animal feed to improve animal production performance and to obtain a high yield of animal proteins. However, the overuse of antibiotics in animal

feeds led to high rate of drug resistance among bacteria and decreased the quality of meat products. The use of antibiotics in livestock has not been allowed in many countries due to adverse consequences. Thus, extensive studies conducted to find valuable alternatives to antibiotics. Recent studies demonstrated that insects are a sustainable source for animal feed in many countries around the world due to their ability to provide nutritional ingredients [214]. Insects have a great efficiency to convert feed composition to utilize the nutrients of the diet better than animals. Moreover, insects produce lower wastes especially ammonia emission and outlets gases than livestock animals. Feeding insects with human-inedible organic wastes, and then rearing poultry with these insects, thus led to an increase in protein content in these animals [215]. It has been suggested that *H. illucens* larvae reduce pathogenic bacteria (*Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella enterica*) in poultry manure [216], therefore BSFL has prophylactic properties with stimulating non-specific immune responses, as well as reduced bacterial burden against *Salmonella gallinarum* [217] Lauric acid with coconut oil showed high activity against three fish pathogens (*Aeromonas hydrophila*, *Saprolegnia parasitica* and *Ichthyophthirius multifiliis*). The SFAs and PUSFAs enhance the immune responses of rainbow trout [218].

Swine dysentery is an economically veterinarian important disease that significantly affects fattening pigs, causing growth retardation and low feed conversion with low mortality rate. Additionally, Animals can show sever symptoms such as a mucohemorrhagic diarrhea with colitis. *Brachyspira hyodysenteriae* is a Gram-negative spirochaete, fastidious, and difficult to be in vitro isolate and cultivated from faeces of infected pigs. For this reason, antibiotic susceptibility assays are difficult to be validated without a proper bacterial isolation, thus spread of antibiotic resistant bacteria are generally induced [219]. Wang and Shelomi [215] stated that *H. illucens* flies diminish the mass and nutrient content of swine manure, which is similar to poultry manure, further these larvae reduce nutrient pollution, and pest fly populations in runoff that improve the farm hygiene. BSFL can be reared on dairy cow manure, which is often mixed with other materials to improve larval yields and total waste reduction due to the high crude fibre content of pure dairy manure that the flies otherwise cannot fully digest. Bovine mastitis considers a significant economic drain on dairy industry worldwide. Caprylic acid, a short-chain fatty acid, and its monoglyceride, are also, known to inactivate mastitis pathogens, including *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*, based on these findings, caprylic acid or monocapryline are a good candidate to treat bovine mastitis [102].

1.7. *H. illucens* larvae fat eradicates MDR human pathogenic bacteria strains

Microbial diseases have been the leading cause of mortality, and resistant microorganisms threaten public health worldwide [220,221]. Currently, the number of deaths increased annually to reach 700,000

due to resistant microbes. Multidrug-resistant (MDR) microbes are expected to cause more than ten million deaths per year by next three decades [222]. Nosocomial bacteria include *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.* are known as “ESKAPE” organisms [223]. These organisms or superbugs are returning in new forms to be resistant to almost all clinically significant antimicrobials.

A significant rise in the occurrence of MDR and extremely drug-resistant pathogens of the *Enterobacteriaceae* group is posing a global economic threat nowadays [222]. Currently, carbapenems, such as imipenem, meropenem, and ertapenem, are recommended as the first-line antibiotics to treat serious infections caused by MDR bacteria [224,225]. Unfortunately, the indiscriminate, injudicious use of carbapenems has led to the appearance of bacteria resistant to these last-resort antibiotics [226]. Nowadays, the presence of NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase-1) in bacteria is one of the most clinically and epidemiologically important resistance mechanisms to carbapenems. The development of new drugs and newer strategies is strongly needed and emphasized by the world health organization WHO to combat antibiotic resistance [221,227], continuously warranting the search for novel bioactive compounds in the field of natural products. More effective and more available drugs with less toxic side effects are in high demand to treat MDR infections [228].

Klebsiella pneumoniae, Gram-negative rod-shaped bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family, is a multidrug-resistant opportunistic pathogen causing one-third of all Gram-negative nosocomial infections [229]. Virulence factors of various pathogenic bacteria such as *E. coli*, *S. aureus*, and *K. pneumoniae* strains include capsular polysaccharides, lipopolysaccharides, fimbriae adhesins, and siderophores, which are crucial for bacteria survival [230–232]. The routes for transmission of *Klebsiella* infections are very diverse, including the respiratory tract causing pneumonia, the blood eliciting bacteraemia, and the person-to-person contacts via contaminated hands. *Klebsiella* spp. can spread very easily and rapidly, but not through the air. Additionally, healthcare settings that are the most vulnerable to *Klebsiella* infections for patients are on ventilators, catheters, or having surgery wounds. Infection of *K. pneumoniae* mainly occurs in the lungs, causing necrosis, inflammation, and haemorrhage within the lung tissue due to the intervention of aspirated oropharyngeal microorganisms into the lower respiratory tract. The infectious dose in humans almost is not known, besides, the incubation period is not fully understood, albeit appearing within a number of days. Thus, the hospital infections caused by *K. pneumoniae* can arise in the different parts of the body and in various forms of sickness depending on the transmission process [233,234].

During past decades, a new type of community acquired hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKp) causing life threatening invasive infections has been described [235,236]. A distinguishing feature of the majority of hvKP strains is hypermucoviscosity, which is due to the overproduction of capsular

polysaccharides and the expression of the plasmid-borne regulator of mucoid phenotype A (*rmpA*) gene and transcriptional activator *rmpA2* gene [237]. Among more than eighty capsular serotypes of *K. pneumoniae* identified to date, K1 and K2 serotypes were considered the cause of most severe hvKP infections [233,238].

1.8. Fatty acids cytotoxicity

Fatty acids and monoglycerides extracted from *Acacia dealbata* showed low or no cytotoxicity, when they tested against various cell lines including mouse neuroblastoma, human keratinocyte, mouse fibroblast [239]. In addition, another study by Petropoulos *et al.* [240] reported that vegetable oils from purslane, linseed, luffa, and pumpkin seeds contains high percentage of fatty acids, which showed a significant effect against two types of cancer cell lines, namely HeLa (cervical carcinoma) and NCI-H460 (non-small cell lung cancer), while exhibited moderate toxicity against non-tumour cells (PLP2 cell line). However, findings obtained by Vilakazi *et al.* [241], did not exhibit cytotoxic effects on normal cells, when treated with PUFA-rich extracts from *Chlorella* sp. Additionally, lipids extracted from brains of silver carp have protective effects against oxidative damage in HEK-293 cells [234].

Chapter 2. Experimental methods of research

2.1. Biological materials

Fat was isolated from alive *Hermetia illucens* larvae of 15 days old by using mechanical pressing machine and provided by the company NordTechSad, LLC (Arkhangelsk, Russia), and used for this study. HEK-293 cell lines (human embryonic kidney) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

The bacterial strains used in this study *Klebsiella pneumoniae* susp. *pneumoniae* ATCC BAA-2473, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Pantoea agglomerans* ATCC 27995, *Xanthomonas campestris* subsp. *Campestris* ATCC 13951, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* ATCC 15713, *Pectobacterium atrosepticum* ATCC BAA-672D, *Dickeya solani* NCBI IPO 2222, *Staphylococcus aureus* ATCC 55804, resistant-*Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-2900 strains were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA. Environmental isolate *Klebsiella pneumoniae* susp. *pneumoniae* KPM9 and clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* susp. *pneumoniae* KP11627 stains were obtained from the State Collection of Pathogenic Microorganisms and Cell Cultures (SCPM, Obolensk, Russia).

2.2. Chemical reagents

Different chemical substances were used in this study including, hydrochloric acid (HCl), acetic acid (CH₃COOH) methanol (CH₃OH), ethanol (C₂H₅OH) carbon tetra chloride (CCl₄), dimethylformamide (DMFA), hexane (C₆H₁₄), dichloromethane (CH₂Cl₂), chloroform (CHCl₃), formaldehyde (CH₂O), acetonitrile (CH₃CN), and isoamyl alcohol (C₅H₁₁OH), ethyl acetate (C₄H₈O₂), acetone (C₃H₆O), and toluene (C₇H₈) were purchased from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. Crystal violet, propidium iodide, ethidium bromide, Glutaraldehyde, phosphate buffer saline (PBS), Osmium tetroxide, epoxy resine, uranyl acetate, and glucose purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Almar blue kit (Thermo Scientific, USA), Vialight MDA Plus kit (Lonza Rockland, Inc, USA) were used for cell viability determination. MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Commercial and prepared antibiotics disks with 6 mm used to determine antibiotic susceptibility such as, penicillin-streptomycin (10 µg/disk), chloramphenicol (Ch) (30 µg /disk), gentamycin (G) (10 µg/disk) and doxycycline (30 µg/disk) purchased from Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. Penicillin (P) (2U/disk), vancomycin (VA) (5 µg/disk), erythromycin (E) (60 µg/disk), rifampicin (RD) (15 µg/disk), kanamycin (K) (1000 µg/disk), and colistin (CT) (10 µg/disk), ciprofloxacin (Cip)

(5 µg/disk), levofloxacin (Lev) (5 µg/disk), cefepime (Cef) (30 µg/disk), and ampicillin (Amp) (200 µg/disk) purchased from Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom.

2.3. Culture media

The following microbiological media were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, including Lauri Brentani (LB) agar and used for growing bacteria, it contains agar 15 g/L, NaCl 10 g/L, tryptone 10 g/L yeast extract 5 g/L, was prepared by dissolving 40 g in 1L of d.H₂O. LB broth often used to culture bacteria in liquid media, it consists of 10 g/L of NaCl, 10 g/L tryptone, and 5 g/L of yeast extract, and it was prepared by dissolving 25 g in 1L of d.H₂O.

Muller Hinton (MH) agar also used to culture bacteria on solid media, it composes of 17 g/L agar, 2.0 g/L beef infusion solids, 17.5 g/L casein hydrolysate, and 1.5 g/L starch, then prepared by dissolving 38 g in 1L of d.H₂O. MH broth components are 2.0 g/L of beef infusion solids, 17.5 g/L casein hydrolysate, and 1.5 g/L starch, prepared by dissolving 21 g in 1 L of d.H₂O, and it was used to culture bacteria on liquid media to be used in the next microbiological experiments.

Tryptone soy agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) was used to determine the twitching motility of bacteria, it was composed of pancreatic digest of 15 g/L, enzymatic digest of soya bean 5 g/L, sodium chloride (5 g/L, and agar 15 g/L, further it was prepared by dissolving 40 g in 1L of d.H₂O. Peptone, tryptone, and NaCl were purchased from (Sigma-Aldrich, USA), while yeast extract was purchased from Difco, USA, and used to prepare the culture media to validate the bacterial motility. The pH of all culture media was adjusted at 7.2±0.2 and all media were autoclaved at 121 °C for 15 min.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (Gibco™ Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA) used for the cultivation of HEK-293 cells supplemented with 10 % FBS and 20 mM 1-glutamine at 37 °C and in the presence of 5% CO₂.

The HEK-293 cell lines (human embryonic kidney) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The cells were grown in recommended culture media supplemented with 10 % FBS and MEM-non-essential amino- acids (Gibco™ Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA), 50 µg/mL gentamicin, 2.5 µg/mL amphotericin B, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, and DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were grown as a monolayer for no more than 14th passages in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C.

2.4. Bacteria cultivation conditions

All bacteria strains were stored in sterile glycerol stock (30%, v/v) at - 80 °C for a long time storage. A single colony from each strain was inoculated to 10.0 mL of LB broth, incubated overnight at 37 °C for the most tested strains. The fish pathogens (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*), and phytopathogenic strains (*Pantoea agglomerans* (Pagg) (ATCC 27995), *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (Xcc) (ATCC 13951), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pbc) (ATCC 15713), *Pectobacterium atrosepticum* (Pba) (ATCC BAA-672D) and *Dickeya solani* (Dsol) (NCBI IPO 2222) were incubated at 28±0.5 °C by shaking at 200 rpm/min. The overnight culture was adjusted to 0.5 McFarland standard (1×10⁸ CFU/mL) for each strain, and used in susceptibility assays. All experiments were implemented in a sterile biosafety cabinet (Safe Fast Elite, Ferrara, Italy).

2.5. *H. illucens* larvae fat extraction

H. illucens larvae fat extract obtained using acidic water methanol solution, and prepared by treatment of 3 g of larvae fat with 10 mL of mixture of water (Milli Q quality), methanol (99.9%, HPLC grade), and hydrochloric acid (37%) in the ratio (90:9:1) at pH < 1. Briefly, 3 g of larvae was melted in 10 mL of extraction solution under hot tap water (52 °C) during 5.0 min, then homogenized thoroughly by vortex V-1 (BIOSAN, Latvia) for 10.0 min and subjected to extraction on the orbital shaker Mixmate (Eppendorf AG, Hamburg Germany) at 2000 rpm/min for 24 h at room temperature. Next, the mixture was sonicated at 35 °C for 10.0 min (Elmasonic S 30H, Singen, Germany), then finally homogenized by ULTRA TURRAX-25 homogenizer (IKA, Deutschland, Germany) at 17,000.0 rpm/min for 10 min. The insoluble fat was separated by centrifugation at 4000 × g for 20 min at room temperature (Centrifuge 5804, Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

The collected supernatant was used for the future experiments in this study. The extraction process was sequentially repeated three times by adding another 10 mL of the extraction solution to the remaining fat pellet. Then, supernatants were validated separately or combined together and concentrated under the vacuum (Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 45 °C during 13 h. The concentrated extract was stored at 4 °C until needed.

2.6. Determination of antimicrobial properties of *H. illucens* larvae fat extracts

2.6.1. Agar disk diffusion assay

The inhibition zone diameter (IZD) for selected bacteria strains were performed according to disk diffusion method, where every strain was cultured, and incubated according to the cultivation conditions,

where MHA petri dishes were streaked with bacterial culture by cotton swab. Then, 50 μL of extract solution were added on 6 mm discs under sterile conditions followed by drying at ambient conditions for 30 min. As a negative control, 50 μL of the extraction reagent (AWM) was used, and as a positive control, 50 μL of antibiotics (penicillin–streptomycin or doxycycline) were used, and prepared at specific concentration according to clinical laboratories standard institute (CLSI) methods. The IZDs surrounded the discs were measured every 12 h.

2.6.2. Turbidimetric assay

The overnight bacterial cultures were adjusted to the density of 1×10^6 (CFU/mL) in fresh LB broth. The larvae fat extract was subjected to two-fold dilutions in LB broth by adding 100 μL of start extract concentration of 50 mg/mL in the first well following by serial of dilutions to get the row of relevant AWME concentrations as 25, 12.5, 6.25, 3.13, 0.78, 0.195, 0.097, and 0.00 mg/mL in the wells. After that, 100 μL of phytopathogenic bacteria with 1×10^6 (CFU/mL) concentration was loaded in each well of 96-well plate (TPP, Trasadingen, Switzerland). The negative (100 μL of AWM extraction reagent) and positive (100 μL of penicillin-streptomycin (P/S) with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration) controls were subjected to the two-fold dilutions.

The turbidimetric assay of pathogenic fish bacteria (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*) was performed by the same way as mentioned above, where the range of AWME3 concentrations were 0.012, 0.024, 0.048, 0.095, 0.19, 0.38, 0.75, and 1.5 mg/mL. Doxycycline (Dox) was used as positive control; it was subjected to the same procedure to obtain the final concentration of 0.008–1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *A. hydrophila* and from 0.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *A. salmonicida*.

The turbidometric assay for human pathogenic bacteria (*K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9, and *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473) was performed by the same manner, where the AWME3 was tested in a range from 2 mg/mL to 0.0156 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while AWME3 was tested against *S. aureus* ATCC 55804, and *A. baumannii* ATCC 19606 in the range (0.012-1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Likewise, the positive control (Doxycycline) was serially diluted by 2 folds dilution in the range from 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.195 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against all *K. pneumoniae* strains. Penicillin-streptomycin (P/S) was tested against *S. aureus* ATCC 55804, and *A. baumannii* ATCC 19606 in the range (0.6-78.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Each dilution was used in triplicates. Then, the plates were sealed, and every strain was incubated according to culture condition section 2.4. The optical density was measured at intervals of every 2 h from 0 h to 24 h at OD₆₀₀ nm by using CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany).

2.6.3. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by turbidimetric assay

The MICs were defined by the visual inspection as the lowest concentration of AWME that were able to inhibit the bacterial growth. The experiment was performed under sterile conditions to avoid any unwanted bacterial contaminations. Every strain was cultured, prepared, and incubated according to cultivation conditions section 2.4.

2.6.4. Determination of the half of inhibitory concentration (MIC₅₀)

The MIC₅₀ was calculated from the Turbidimetric assay at 6 h, 12 h, and 24 h. Briefly, the 100 μ L of bacterial suspension at the final density 5×10^5 (CFU/mL) was added to 96 well plates, which contained an aliquot of 100 μ L of *H. illucens* larvae fat extract and positive control (P/S) were diluted in LB broth as mentioned above in section 2.6.2. For each sample, MIC₅₀ was determined using non-linear regression mode of Graph Pad Prism™ software, version of 6.07 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The IC₅₀ values are expressed as the inhibitory dose of AWME that reduced the tested bacteria growth by 50% of the untreated bacteria control.

2.6.5. Determination of minimum bactericidal concentration (MBC)

The MBC for AWME and positive control (P/S or Dox) was determined according to the MIC values. Thus, 30 μ L of the mixture from the 1 \times MIC, 2 \times MIC, and 4 \times MIC wells of the TB assay was sub-cultured on MH agar plates, incubated for 24 h according to cultivation condition for each strain. MH agar plates were further incubated for 48 h. The lowest concentration of the AWME extracts, at which no bacterial growth or inhibited the growth with 99.99% was observed, was accepted as MBC for this strain.

2.7. Multidrug-resistant assessment

Antimicrobial susceptibility was determined using the disk diffusion technique. Each strain was classified as sensitive (S), intermediate (I), and resistant (R) according to the CLSI, 2018 breakpoints. The inhibition zone diameters (IZD) were measured, compared to the measures of the CLSI guidelines [235]. Strains resistant to three or more antibiotic classes were defined as multidrug-resistant (MDR), strains resistant to all tested categories except 2 categories of antibiotics were classified to be extensive multidrug-resistant (XDR), while strains resistant to all categories of antibiotics were classified to pandrug-resistant (PDR) [236]. All data values recorded at 12 h and 24 h of incubation.

2.8. Bacterial resistance assays

The bacterial resistance to AWME3 isolated from *H. illucens* larvae fat was performed after determination of the MIC values of the AWME3 and tested antibiotics. Human MDR bacteria strains were sub-cultured with 0.125 MIC (31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentration of the AWME3, and positive control (P/S) for 16 consecutive days to investigate their ability to develop resistance to tested drugs. Briefly, bacterial cultures were harvested at the mid-logarithmic phase, washed three times with PBS (pH 7.4) and diluted to 5×10^5 (CFU/mL) in fresh LB medium, containing 0.125, 0.5, 1, 2, and 4 MIC concentrations of AWME3, or antibiotic, then incubated at 37 °C for 24 h. Aliquots of cultures from the second highest concentration of AWME3 (0.25 MIC) or antibiotic that allowed growth ($\text{OD}_{600} > 0.1$) were diluted 1:100 in fresh LB medium which containing the same set of MIC concentrations that based on the most recently observed MIC. With increasing concentrations of AWME3 or the antibiotic, the serial passaging was repeated during 16 days for every strain, to test the stability of resistant strains, the strain that induce resistance equal or higher than the MIC, was cultured on LB agar plates, then single colony was subjected to resistance assay for five days.

2.9. *K. pneumoniae* biofilm analysis

2.9.1. Biofilm formation

Biofilm formation was analysed on 96-well polystyrene microtiter plates using crystal violet method. *K. pneumoniae* strains were grown on LB broth and incubated overnight at 37 °C. Bacterial cultures were adjusted to $\text{OD}_{600} \sim 0.1$, then the cultures left to grow without shaking for 24 h at 37 °C, then the planktonic cells were removed and washed carefully with PBS (pH 7.2 ± 0.2) without disturbing possible biofilm formation along the wall or attached on the bottom, then dried at 37 °C for 40 min. After that, 125 μL of crystal violet (1.5%) was added to each well and incubated at room temperature for 15 min. The plate was washed 3 times with d.H₂O to remove the stain, then, drayed at 60 °C for 1 h. Next, 125 μL of acetic acid (30%) was added to each well, then incubated at room temperature for 10 min with shaking at 400 rpm/min. The absorbance was measured at 550 nm. Biofilm formation (BF) was determined according to the formula: $\text{BF} = \text{AB} - \text{CW}$, where AB is the OD of the wells attached by bacteria, and CW is the OD of the stained control wells (no bacterial cells). Biofilm production by each strain was scored as either strong ($\text{BF} \geq 0.300$), moderate ($\text{BF} = 0.200 - 0.299$), weak ($\text{BF} = 0.100 - 0.199$), or negative ($\text{BF} < 0.100$).

2.9.2. Autoaggregation assay

Autoaggregation assay included cell clumping and sedimentation, where all *K. pneumoniae* strains were grown overnight in LB broth at 37 °C with shaking 200 rpm/min. After centrifugation at 3000 ×g for 7 min, bacterial pellets were resuspended in PBS (pH 7.4) to get an OD₆₀₀ ~ 0.5 (OD_{initial}). Next, cells were treated with sub-MIC (0.125 mg/mL) of AWME3, then treated and untreated (control) bacteria were incubated for 6 h at 37 °C in static conditions, and the supernatant of each bacterial suspension was measured at OD₆₀₀ (OD_{final}). Autoaggregation (%) was calculated using the following equation: Autoaggregation (%) = (1 – OD_{final}/OD_{initial}) × 100

2.9.3. Mucoviscosity, string, and precipitation assays

The mucoviscosity of *K. pneumoniae* strains was determined by performing the sedimentation assay. Briefly, overnight culture grown in LB broth was diluted at OD₆₀₀ to 0.1 in media, then grown at 37 °C with or without the sub-MIC (0.125 mg/mL) of AWME3. After that, the culture incubated overnight, then centrifuged for 5 min at 1000 × g. The supernatant was removed without disturbing the pellet for OD₆₀₀ measurement, and left in standing condition for 15 mins, later visually tested for mucoidy or no mucoidy supernatant and dense pellet. The hypermucoviscous phenotype of *K. pneumoniae* isolates was confirmed by string test. Briefly, the bacterial strains were grown on agar plate at 37 °C overnight and the formation of a mucoviscous string measuring >5 mm on a bacteriology inoculation loop was defined as a positive string test.

2.9.4. Hydrophobicity test

The microbial adhesion to organic solvents test was performed to evaluate the hydrophilic/hydrophobic nature of bacterial cell surfaces. The cell surface hydrophobicity of biofilm-forming *K. pneumoniae* strains was determined in the presence of AWME3. Cells, which were treated with a sub-inhibitory concentration of AWME3 (125 µg/mL) for 4 h at 37 °C, non-treated cells were used as a control. Cells were centrifuged at 4000 rpm for 5 min and the resulting pellets were washed twice and re-suspended in PBS (pH 7.4) to 0.5 at OD₆₀₀ (OD_{Initial}). 1.0 ml of each solvent separately (hexane, ethyl acetate, chloroform, toluene) was added to each suspension (3.0 mL), followed by vortexing for 2 min and incubated at room temperature. After 30 min of incubation, the OD of the aqueous layer was measured at 600 nm (OD_{treatment}), and hydrophobicity (%) of treated and untreated

samples was calculated using the following equation: Hydrophobicity (%) = $(1 - \text{OD}_{\text{Treatment}} / \text{OD}_{\text{Initial}}) \times 100$.

2.10. Bacterial virulence factors validation through motility assays

2.10.1. Swarming motility

K. pneumoniae strains were grown on LB agar with or without sub-MIC of AWME3 for 24 h at 30 °C. Then, swarming agar plates containing 1% glucose (Sigma-Aldrich, USA), 0.5% peptone (Sigma-Aldrich, USA), 0.2% yeast extract (Oxoid, UK), and 0.5% agar (Sigma-Aldrich, USA) were equilibrated at room temperature and inoculated at the centre with 10 µL of each strain of *K. pneumoniae* suspension containing 10^8 CFU/mL in the presence and absence (control) of Sub-MIC ($\frac{1}{2}$ MIC) of AWME3. Plates were incubated without inversion for 24 h at 30 °C, then swarming motility was measured as the size in mm of the bacterial cells migration from the injection point towards the agar plate edges on the surface.

2.10.2. Swimming motility

K. pneumoniae strains were seeded on LB agar (Sigma-Aldrich, USA) and incubated at 37 °C for 24 h. Then, one colony of each isolate was inoculated, in the presence, or absence (control) of $\frac{1}{2}$ MIC AWME3, on the surface of swimming agar plates containing 1.0% tryptone (Oxoid, UK), 0.5% sodium chloride (Sigma-Aldrich, USA), and 0.3% agar (Difco, USA), previously equilibrated at room temperature. Plates were incubated without inversion for 24 h at 30 °C. Then, swimming motility was measured as the size in mm of the bacterial cells migration from the injection point towards the agar plate edges on the surface

2.10.3. Twitching motility

K. pneumoniae bacteria strains were seeded on LB agar (Sigma-Aldrich, USA) and incubated at 37 °C for 24 h. Then, one colony of each isolate was inoculated, in the presence, or absence (control) of $\frac{1}{2}$ MIC AWME3, to the bottom of twitching agar plates containing 1.0% tryptone (Oxoid, UK), 0.5% yeast extract (Oxoid, UK), 1.0% sodium chloride (Sigma-Aldrich, USA), and 1.0% agar (Difco, USA). Plates were inverted and incubated at 37 °C for 24 h. Subsequently, the agar was carefully removed, and the motility zone was measured to the nearest millimetre after staining with 2% crystal violet (Sigma-Aldrich, USA) for 2 h. As a negative control, each strain was inoculated in tryptone soy agar (Difco, USA) under the same conditions, then twitching motility was measured as the size in mm of the bacterial cells migration from the injection point towards the agar plate edges under the agar layer.

2.11. Inhibition of biofilm formation by AWME3

Biofilm formation inhibition assay evaluated using crystal violet assay in 96-well microtiter plate. *K. pneumoniae* strains were cultured over night at 37 °C, then harvested, washed thrice by PBS (pH 7.4), and adjusted to suspension 10⁶ CFU/mL. The 100 µL of AWME3 was diluted by 2-folds dilution in LB broth to give final four concentrations (1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL) in 96-well plate. For negative control, 200 µL of LB broth was added to the 96-well plate in triplicate. Next, 100 µL of bacterial suspension was added to each well unless the negative control, then incubated at 37 °C for 24 h without shaking. The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) and the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) of the formed biofilms were determined, where the MBIC was identified as the lowest concentration of AWME3 or the antibiotic (Dox), which show no growth. MBEC was determined by transferring aliquots (30 µl) of scraped biofilms to LB agar plate, and it was identified as the lowest concentration of AWME3 or antibiotic (Dox), which prevent the bacterial growth.

On the other hand, after incubation for 24 h, planktonic cells were removed by washing with PBS (pH 7.2) for three times, followed by drying at 37 °C for 40 min. After that, 125 µL of crystal violet (1.5%) was added to each well and incubated at room temperature for 15 min. The plate was washed 3 times with d.H₂O to remove the excess stain, then, drayed at 60 °C for 1 h. Next, 125 µL of acetic acid (30%) was added to each well, then incubated at room temperature for 10 min with shaking at 400 rpm/min. The absorbance was measured at 550 nm. The percentage of biofilm inhibition was calculated using the following formula:

$$\% \text{ of biofilm inhibition} = [\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{treated}} / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100$$

2.12. Inhibition of mature biofilms formed by *K. pneumoniae* strains by AWME3 treatments

The biofilm disruption assay was performed in a 96-well polystyrene plate (TPP, Switzerland) The bacteria were grown in microtiter plates for 48 h at 37 °C to form the mature biofilms in the wells of microtiter plate. The media was then decanted gently and washed using PBS (pH 7.2) buffer to remove loosely adhered cells. Freshly prepared media LB broth was added to the wells of the plate and AWME3 was added, to give the final concentrations of 0.25, 0.500, 1.0, 2.0 mg/mL. The polystyrene plate was incubated for the next 24 h under static conditions. The MBIC and MBEC were determined by the same method (2.10.6). After incubation for 48 h, the wells of the microplate were washed using sterile PBS to remove the planktonic cells, followed by staining with crystal violet (0.1% solution in water) for 30 min. The stain was removed and plate was gently

washed with d.H₂O, dried at 60 °C for 60 min, and biofilms were dissolved by 30 % acetic acid. The absorbance was recorded using a CLARIOstar microplate reader and percent disruption was calculated with respect to the control group.

2.13. Inhibition of mixed biofilms formed by *K. pneumoniae* strains by AWME3 treatments

The disruption of the mixed biofilm assay performed and quantified in polystyrene 96-well plate (TPP, Switzerland). AWME3 was serially diluted by 2-fold dilutions in 96-microtiter plate to give final concentrations in the range of 0.08-1.0 mg/mL. All three *K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9, and *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 were grown in LB broth media, harvested, washed twice with PBS, and each strain was adjusted to 10⁶ CFU/mL. The mixed bacterial culture formed from an equal volume (1.0 mL) of each strain (1:1:1). The 0.1 ml of mixed bacteria with suspension 10⁶ CFU/mL was introduced to each well of the 96-microplate. Negative control was LB broth only and the positive control was the mixed biofilm without treatment. The microtiter plate was sealed to prevent the evaporation, followed by incubation at 37 °C for 24 h. The planktonic cells in the mixed biofilm were removed during gently washing with PBS, dried, stained with 125 µL 0.1% of crystal violet (CV) solution and incubated at room temperature for 15 min. The excess stain was removed and rinsed with d.H₂O, dried, and finally 125 µL of 30% acetic acid was added to each well to dissolve the mixed biofilm to be measured at 570 nm. The percent of the inhibition of the mixed biofilm was calculated by the following formula:

$$\% \text{ mixed biofilm reduction} = [\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{assay}} / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100.$$

2.14. Disruption of *K. pneumoniae* membrane by AWME3

2.14.1. Relative electric conductivity

The relative electric conductivity (REC) value was calculated based on the electric conductivity measurements, and used as a measure of the bacteria membrane permeability. *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 was cultured in 10 mL LB broth at 37 °C for ten hours under shaking, then centrifuged at 4200 rpm/min for 10 min. Then, the bacteria pellet was washed with 5% of glucose in the water until its REC value was equal or near to the REC value of the washing buffer (5% glucose), generating a so-called isotonic bacteria solution. The AWME3 at four different concentrations (0.5 MIC, MIC, 2 MIC, and 4 MIC) were diluted in 5% glucose, and the electric conductivities of the mixtures were measured using a conductometer (Ionomer, Moscow, Russia) and marked as *L₁*. Then, the same concentrations of AWME3 were added into the isotonic suspension of *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 at 10⁸ CFU/mL.

After intensive mixing, the samples were incubated at 37 °C for eight hours, and the conductivities were measured and marked as L_2 . The bacteria in 5% glucose were boiled in the water bath for 5 min and served as the positive control, using their conductivity marked as L_0 . The relative electric conductivity was calculated according to the formula $(\%) = (L_2 - L_1)/L_0 \times 100$, reflecting the bacteria membrane permeability value.

2.14.2. Crystal violet uptake assay

The alteration in membrane permeability was determined by crystal violet assay. The impact of AWME3 on the membrane permeability of all *K. pneumoniae* strains was determined using crystal violet stain. After incubation in LB medium at 37 °C overnight, *K. pneumoniae* strains were harvested and washed with PBS (pH 7.4) three times. The pellets were resuspended in PBS and mixed with AWME3 at the concentration from $\frac{1}{4}$ MIC to 2 MIC for 4 h. Bacterial cells were incubated with 1% crystal violet in the dark for 15 min. After centrifugation, the absorbance of the supernatant was determined by measuring the OD 590 nm using CLARIOstar microplate reader (BMG, Germany). The absorbance of crystal violet was considered as 100%. The crystal violet uptake was calculated using following formula: % of take up = $(OD_{\text{sample}}) / (OD_{\text{crystal violet}}) \times 100$.

2.14.3. Ethidium bromide uptake assay

K. pneumoniae strains were harvested and washed with PBS (pH 7.4) three times. The pellets were re-suspended in PBS and mixed with AWME3 at the concentration from $\frac{1}{4}$ MIC to 2 MIC for 4 h. Next, bacterial cells were incubated with ethidium bromide (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), in the dark for 15 min. After centrifuging the 96-microplate, the supernatant was analysed using an excitation 530 nm and detection of 585 nm wavelengths. A control sample (containing EtBr but no bacteria) allowed normalization of the data and represents the maximal fluorescence intensity using CLARIOstar microplate reader (BMG, Germany).

2.15. Biofilm disruption by AWME3 visualized through microscopy techniques

2.15.1. Light microscopy

The ability of AWME3 extract from *H. illucens* larvae fat to inhibit biofilm formation has been confirmed by a microscopic technique. Briefly, the biofilm of *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain was grown on glass cover slides (1 cm^2) (Thermo scientific, USA) placed in 6-well polystyrene plates (TPP, Switzerland). In particular, aliquots of 1.0 mL of bacterial culture was adjusted $\text{OD}_{600} \sim 0.2$, then it was dispensed on the cover glass, incubated for 6h in static conditions at 37 °C. After that, the

wells were filled with different concentrations of AWME3 (0, 125, 250, 500 µg/mL), reaching a final volume of 2 mL in each well, before aerobic incubation at 37 °C for 24 h without shaking. For negative control, bacterial cultures without treatment were used. After incubation, the supernatant was removed plates were washed with PBS three times to remove the planktonic cells, fixed with 90% ethanol for 15 min, and completely dried at 30 °C. Then, biofilms were stained with 1% crystal violet for 20 min at room temperature. The excess dye was washed with distilled water. Finally, dried stained glass covers were placed on slides and were observed at 40X magnification of the light microscopy (Nikon, Model: ECLIPSE TS 100, Tokyo Boeki, Japan).

2.15.2. Fluorescence microscopy

Biofilm architecture in the absence and in the presence of AWME3 extract was evaluated by fluorescence microscopy analysis. *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain was grown on glass cover slides (1 cm²) (Thermo scientific, USA) placed in 6-well polystyrene plates. In particular, aliquots of 1.0 mL of the starter bacterial culture with bacterial suspension (OD₆₀₀ ~0.4) were dispensed on the cover glass, then the wells were filled with different concentrations of AWME3 (0, 125, 250, 500 µg/mL), reaching a final volume of 2 mL in each well, then incubated aerobically at 37 °C for 24 h in static conditions. For negative control, bacterial culture without treatment with AWME3 were subjected to the same conditions of incubation. After 24 h of incubation, the supernatant was removed, plate was washed three times with PBS, fixed with 90% ethanol for 15 min, and completely dried at 30 °C. Next step, biofilms were stained with 1 mM propidium iodide (PI) for 15 min at room temperature. The excess of dye was washed with distilled water. Finally, biofilms were observed with a fluorescent microscope (Life technologies, Bothell, WA, USA) equipped with a digital camera. Digital images were acquired using the 40X objective. PI (excitation wavelength 543 nm; emission wavelength 617 nm) emits red fluorescence. All obtained images were analysed using Fiji Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, USA) to obtain the mean fluorescence intensities from biofilms.

2.15.3. Scanning electron microscopy (SEM)

Treated and untreated by AWME3 biofilm of *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain was examined by scanning electron microscopy (SEM). *K. pneumoniae* cells were cultured and grown on 1 cm² cover glass (Thermo scientific, USA) in 6 well plate (TPP, Switzerland) for 6 h. Next, various concentrations (0.0, 0.125, 0.250, 0.500 mg/mL) of AWME3 were added to the formed biofilm in 96-microtiter plate, then incubated for 24 h at 37 °C without shaking, further the planktonic cells were

removed by washing with PBS (pH 7.4) three times. All adhered biofilms on the surface of the glass coverslips were fixed with 2.5% glutaraldehyde (pH 7.2) overnight at 4 °C, washed three times with rinsing buffer PBS at 4 °C for 15 min and dehydration of the biofilms in a series of ethanol solutions (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, and 95%). All dehydrated glass coverslips were visualised under scanning electron microscopy (TESCAN, Kohoutovice, Czech Republic).

2.16. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of AWMEs analysis

The GC-MS analysis was conducted by using GCMS-QP2010 ultra mass spectrometer (Shimadzu, Canby, OR, USA) and PAL 5000 autosampler (Gerstel, Zwingen, Switzerland). Separation of bioactive compounds was carried out by using capillary column DB-5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) coated with non-polar silphenylene polymer virtually equivalent polarity to 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane stationary phase (Restek, Bellefonte, PA, USA). Operation conditions were as follows: the injector and detector temperatures were set at 280 °C and 250 °C, respectively. The 1 µL of mixture was injected automatically by split-less mode, furthermore were analysed also, separately. The temperature program was as follow: the initial temperature 40 °C was held for 1 min, and then it was increased at 15 °C/min until 210 °C, held for 0 min, increased at 5 °C/min until 216 °C, held for 0 min, increased at 40 °C/min until 300 °C, and finally held for 14.87 min. The helium was used as the carrier gas, with a linear velocity of column flow from 1 to 15 mL/min, and the column head pressure was 50.4 kPa. Fatty acids content of AWMEs were identified by using a mass spectrometer (MS). MS operated in the electron ionization mode and mass spectra were collected within m/z from 33 to 1000. The qualitative analysis of compounds based on the comparison of their spectral mass with those of NIST mass spectra database (NIST 08, 2008). Compound chromatogram peaks' matching similarity index (SI) greater than 70% in NIST library were assigned.

2.17. Mechanism of AWME3 antibacterial action against MDR *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strains

2.17.1. Bacterial morphological changes visualized by SEM microscopy after AWME3 treatments

Scanning electron microscopy analysis performed using single colony of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 was cultured in 5 mL LB broth and incubated at 37 °C under shaking at 180 rpm/min overnight. Bacterial cultures were centrifuged at 4000 × g for 10 min, and then bacterial pellets were washed 4 times by PBS (10 mM, pH 7.2) at 4 °C and centrifuged at 4000 × g for 5 min. The bacterial cultures of *A. baumannii* ATCC 19606 were adjusted to OD₆₀₀ ~ 0.2 by PBS, and then treated

with 0.5, 1, and 2 MIC, and incubated for 12 h, 20 min, 10 min, respectively, while *S. aureus* ATCC 55804 culture was treated with 1, 2, and 4 MIC of AWME3 and incubated for 12 h, 20 min, 10 min, respectively. The untreated samples (controls) were prepared by the same way. All bacterial cultures were harvested at check points and centrifuged at $5000 \times g$ at 4 °C for 10 min, then all bacterial pellets were washed 3 times by PBS (10 mM, pH 7.2), and then 100 μ L of every culture were spread on a glass slide (Thermo scientific, USA), dried under a sterile condition in a cabinet for 20 min. Subsequently, the bacterial cells were fixed overnight with 500 μ L of 2.5 % (v/v) glutaraldehyde at 4 °C. The fixed samples were washed twice with 10 mM PBS followed by dehydration in gradient ethanol solutions (50, 70, 90, and 95 %) for 10 min. Finally, samples were viewed with the scanning electron microscopy (TESCAN Co., Brno-Kohoutovic, Czech Republic).

2.17.2. Alteration of bacterial cell compartments visualized by transmission electron microscopy

All samples of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 were prepared according to the previous method described in 2.14.1, but 0.5 mL of 2.5 % (v/v) glutaraldehyde were added to the samples in 15 ml tubes and incubated overnight at 4 °C for fixation. After overnight incubation, the bacterial cells were fixed with 2% osmium tetroxide for 70 min after removing the 0.5 mL glutaraldehyde. The fixed samples were washed three times with PBS (pH 7.4) and dehydrated for 15 min. Then, the samples dehydrated for 10 min in both a mixture (1:1, v/v) of absolute ethanol and absolute acetone. The samples were transferred to a mixture (1:1, v/v) of absolute acetone and epoxy resin for 30 min followed by incubation 1.0 ml of pure epoxy resin for overnight at a constant temperature 4 °C. Finally, the bacterial specimens were sectioned using an ultramicrotome (JEOL Ltd, Akishima, Tokyo, Japan). An aliquot of 5 μ L of each culture was placed on the surface of a 300-mesh copper grid (Sigma-Aldrich, USA) and incubated at room temperature for 3 min. After excess fluid was removed, bacteria were stained for 30 s with 1% uranyl acetate (Sigma-Aldrich, USA). Stained cells were imaged using transmission electron microscopy (JEOL Ltd, Akishima, Tokyo, Japan), and the magnification performed at 10 000x.

2.17.3. Changes in bacterial cell dimensions determined by atomic force microscopy (AFM)

The samples of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 were prepared similar accordingly to the method, described in section 2.14.1 with some modifications. All bacterial cultures were harvested at checkpoints and centrifuged at $5000 \times g$ at 4 °C for 10 min, then all bacterial pellets were washed 3 times by PBS (10 mM, pH 7.2). After that the 100 μ L of every culture were spread on a glass slide (Thermo scientific, USA), dried under a sterile condition in a cabinet for 20 min.

Subsequently, the bacterial cells were fixed overnight with 500 μ L of 2.5 % (v/v) glutaraldehyde at 4 °C. The fixed samples were washed twice with 10 mM PBS followed by dehydration in gradient ethanol solutions (50, 70, 90, and 95 %) for 10 min. Surface topography of treated and untreated (control) bacteria were imaged using AFM (NT-MDT, Moscow, Russia). Air dried samples were used for AFM imaging, where this mode of imaging is generally performed to evaluate the alterations in the bacterial morphology caused by AWME3.

V-shaped cantilevers with oxide-sharpened Si₃N₄ tips were used with spring constants. The silicon nitride tip was irradiated with ultraviolet in air for 15 min to remove any organic contaminants prior to use. The curvature radius of the tips is less than 10 nm, and the length, width, and thickness of the cantilevers are 183, 34, and 3.0 μ m, respectively, with an oscillation frequency of 144 kHz and a force constant of 6.0 N/m. AFM, images and force measurements were recorded in contact mode at room temperature. Different areas were scanned and the images were analysed with Image Analysis P9 (IAP9) application software (NT-MDT co., Moscow, Russia) to obtain the morphological characteristics (length, width, height, roughness, root mean square of surface-RMS, Kurtosis-Ska, Skewness-Ssk). In each sample, (control as well as treated) an average 35-50 cells were selected randomly from two independent experiments, and were imaged to ascertain the effect of AWME3 treatment on cell surface morphology.

2.17.4. Salt tolerance assay

The effect of salt concentration on the bacterial cells viability in the presence or absence (control) of AWME3 extract isolated sequentially from the *H. illucens* larvae fat was conducted in 96-well plate (TPP, Switzerland). The salt tolerance effect of *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 treated with the MIC and 2 MIC concentrations of AWME3 was evaluated on nutrient agar (NA) plates supplemented with different concentrations of NaCl. Fresh bacterial cultures were incubated at 37 °C overnight. After incubation, the overnight cultures of *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 were treated with AWME3, then incubated for 60 min at 37 °C. Then, the samples were serially diluted and inoculated on NA plates, supplemented with different concentrations of NaCl (0 %, 2.5 %, 5 %, and 10. %). (NA-NaCl plates) Bacterial culture without AWME3 was used as the control for each NA-NaCl plate. The results were expressed in terms of Log₁₀ CFU/mL as the mean of three independent experiments.

2.17.5. Time- killing assay

The antimicrobial activity of AWME3 over time was determined against *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606. Overnight bacterial cell cultures were suspended in LB broth and

adjusted to an absorbance of 10^6 CFU/mL. Different concentrations of the AWME3 extract of *H. illucens* larvae fat or positive control (P/S) were added to the inoculum suspensions with final concentrations 0.5 MIC, MIC, 2 MIC, and 4 MIC, and incubated at 37 °C for 24 h under shaking 180 rpm/min. Aliquots were removed from the inoculum cultures after 0, 5, 10, 20, and 60 min, and then extended to 12 h, and 24 h of incubation. After incubation, the bacterial cultures were serially diluted, plated on MH agar and incubated for 24 h at 37 °C. The viable bacterial cells (CFU) were counted, and the degree and level of killing were determined by plotting the log CFU/mL against time with at least three independent experiments, analysed with one-way ANOVA followed by Dunnett's test to determine the significance relative to the untreated bacteria ($P < 0.05$).

2.17.6. Cytoplasmic contents leakage assay

The measurement of the release of 260 nm absorbing materials from *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 were determined by measurement the releasing of cytoplasmic contents. Cells from the 5 mL of bacterial suspension were collected by centrifugation at $5,000 \times g$ for 10 min, washed three times with 0.1 M PBS (pH 7.4), and resuspended in PBS (0.1 M, pH 7.4) to bacterial density 10^6 CFU/mL. The 3.0 mL of cell suspensions was incubated at 37 °C under agitation in an environmental incubator shaker for 0 h, 1 h and 2 h in the presence and absence (control) of AWME3 of two concentrations (MIC, 2 MIC). Then, the suspensions were centrifuged at $4000 \times g$ for 5 min. After that the absorption at 260 nm, 280 nm of supernatants was measured after filtration with 0.22 μ M syringe filter (Sartorius, Kings Norton, Birmingham, United Kingdom) using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Results were presented in terms of optical density of 260 nm and, 280 nm absorbing materials. Mean OD values of respective treatments and vehicle control were compared independently at each time point.

2.17.7. Almar blue assay

Cell viability assay was carried out in 96-well plate using Almar blue (AB) cell viability assay reagent kit (Thermo Scientific, Loughborough, UK). The efficacy of AWME3 isolated from *H. illucens* larvae fat was assayed using AB kit. For the assay, 100 μ L of AWME3 were serially diluted in 2 fold dilutions in MH broth medium to get the final concentrations (1.5, 0.75, 0.38, 0.19, 0.095, 0.048, 0.024, and 0.012 mg/mL). Then, 100 μ L of bacterial with density 10^6 CFU/mL of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 was added to the plate, and then the plate was sealed to avoid evaporation and

incubated for 24 h at 37 °C. Similarly, the positive control (P/S) was evaluated at the range concentrations (0.6-78.125 µg/mL) against *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606, followed by incubation at the same condition after bacterial cultures were seeded in 96-well plate. After that, 20 µL of AB was added to each well. AB specific activity was determined after 4 h of incubation at 37 °C with shaking at 160 rpm/min. Finally, measure the AB fluorescence at excitation 540-570 nm, and emission at 585-615 nm. Data expressed as a percentage of viability, when compared with untreated cells. Furthermore, the blank included during the AB incubation was wells without cells (AB only). The viability was calculated based on comparison with the absorbance of untreated and treated cells. The MIC50 values were obtained from the concentration of the AWME3 of *H. illucens* larvae fat that induced 50% inhibition of cell growth using the Graph Pad prism 7.0 software.

2.17.8. Intracellular ATP assay

The effect of AWME3 on cellular ATP levels of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 was determined using ViaLight MDA Plus assay kit (Lonza Rockland, Inc, USA) following manufacturer's instructions. The assay was performed in 96-well U-bottom opaque white microtiter plate in triplicate. *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 were grown in MH broth at 37 °C overnight and cells were harvested by centrifugation, washed and resuspended in fresh medium. Next, a 50 µL of MH broth was added to 96-well opaque plate, and then 50 µL of AWME3 was diluted in 2 fold dilutions at different concentrations (0.75, 0.38, 0.19, 0.095 mg/mL). Likewise, positive control (P/S) was diluted in 2 fold dilutions under the same condition at concentrations (4.88-39 µg/mL), after that 50 µL of 10⁶ CFU/mL was added to each well and incubated for 24 h at 37 °C. Next, 50 µL of bactolyse plus was added to each well, and then incubated at room temperature for 10 min without shaking. Next, 100 µL of AMR plus was added to each well and incubate at room temperature for 2 min. Opaque microtiter 96-plate (Thermo scientific, USA) was inserted into the BMG CLARIOstar Reader, the ATP luminescence was recorded. Signals represent the mean of three replicates for each measurement.

2.17.9. Propidium iodide uptake (PI-Uptake) assay

Membrane permeability considers a significant evidence for the disruption or cell membrane leakage due to the activity of AWME3. PI is generally utilized as a DNA dye that can enter cells with damaged cell membrane, but it cannot enter cells with an intact cell membrane. *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 were grown on MH broth overnight at 37 °C under shaking 180 rpm/min. Cells

were washed three times with a buffer containing 5 mM HEPES and 20 mM glucose at pH 7.2, then adjusted to obtain a bacterial suspension with densities equivalent to a 0.5 McFarland turbidity standard, and then incubated with 7.5 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich) at 37 °C for 10 min. After incubation, the *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 cells were treated with different concentrations of AWME3 (0.095-0.76 mg/mL) for 10 h, and the fluorescence intensity of the PI dye was monitored every 5 min using the CLARIOstar microplate reader at an excitation wavelength of 543 nm and an emission wavelength of 615 nm. The PI-uptake (%) was calculated based on the normalized data that are the mean ± SD of three independent experiments, one-way ordinary ANOVA Dunnett's multiple comparisons test (*p < 0.05) was significant.

2.18. MTT cytotoxicity assay

MTT assays were carried out in 96-well plate (PTT, Switzerland). For the assay, 100 µL of AWME3 were serially diluted in 2 folds dilutions in DMEM medium to get the final concentrations (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, and 7.813 µg/mL), then added to 96-well plate, which contained 100 µL of HEK-293 cells, further the plate was incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After that, 20 µL of 5 mg/mL MTT was added to each well (1 × 10⁴ cells/well). MTT specific activity was determined after 2 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, then 100 µL of DMSO was added to 96-well plate. The plate was shaken for 10 min to dissolve the formazan crystals. Data expressed as a percentage of viability, when compared with untreated cells. Furthermore, the blank included during the MTT incubation was wells without cells (DMSO+MTT). The viability was calculated based on comparison with the absorbance of untreated and treated cells. The IC₅₀ values were obtained from the concentration of the AWME3 of *H. illucens* larvae fat that induced 50% inhibition of cell growth using the Graph Pad prism 7.0 software. The optical density (OD) in each well was determined with a microplate reader CLARIOstar using an absorption spectrum of 580 nm. The experiment performed in triplicate and repeated in three different times.

2.19. Statistical processing of results

The experiments were implemented in triplicate and repeated three times to be reproducible. Statistical processing of the research results was carried out using standard Microsoft Office Excel package by calculating the standard deviation (SD) and the standard of error means (SEM). The one-way ANOVA, two-way ANOVA, and non-linear regression mode were conducted to analyse the results using the statistical analysis software Graph pad Prism 7.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The significance level was (P < 0.05).

Chapter 3. *Hermetia illucens* larvae fat inhibit and eradicate phytopathogenic bacteria

3.1. Bioactive compounds extracted from the *H. illucens* larvae fat

Several attempts were conducted to choose the best solvent for the extraction of antimicrobial compounds from the lipid part of the black soldier fly larvae (BSFL), thus we tested BSFL fat solubility in 21 organic solvents individually or in combination. To increase the yield extract, we adjusted the concentration of fat to be ranged from 10 % to 30% (w/v) for each solvent at room temperature. The different fat ratios (10-30%) were melted under hot tap water in the presence of single or combined organic solvent. Fat hydrophobicity increased with fat ratio, where all melted fat ratios (10-30%) were diluted 10 times (10x) using d.H₂O. We found that the fat was soluble in almost all non-polar reagents including, CCl₄, C₆H₁₄, CH₂Cl₂, CHCl₃, DMFA, and CH₃CN, and also, in combination (9:1, v/v) such as C₆H₁₄ + C₃H₆O, C₆H₁₄ + CH₃CN, DMSO + C₃H₆O, C₆H₁₄ + CH₃CN, C₆H₁₄ + CH₃CN DMSO + C₃H₆O, DMSO + CH₃CN, CHCl₃ + CH₃CN, CHCl₃ + C₃H₆O, C₅H₁₁OH + C₃H₆O, C₅H₁₁OH + DMSO (Table.1).

Table 1. Assessment of BSFL fat solubility

Fat (%) / Solvent	10% Fat	10% Fat+ H ₂ O	15% Fat	15% Fat+H ₂ O	20% Fat	20% Fat+H ₂ O	25% Fat	25% Fat+H ₂ O	30% Fat	30% Fat+H ₂ O
CCl ₄	+	±	+	±	+	±	+	---	+	---
C ₆ H ₁₄	+	+	+	+	+	±	+	---	±	---
CH ₂ Cl ₂	+	±	+	+	+	+	±	---	±	---
DMSO	±	+	±	+	±	+	±	---	---	---
CHCl ₃	+	---	±	±	±	±	±	---	±	---
DMFA	+	±	±	±	±	±	±	---	±	---
CH ₃ CN	+	±	±	±	±	±	±	---	±	---
CH ₃ OH	±	±	---	---	---	---	---	---	---	---
C ₅ H ₁₁ OH	+	±	+	±	+	±	+	---	+	---
C ₂ H ₅ OH	±	+	±	±	±	±	±	---	±	---
C ₃ H ₆ O	±	+	±	+	±	+	±	---	±	---
CHCl ₃ + DMFA (9:1, v/v)	+	±	+	±	+	±	+	---	+	---
C ₆ H ₁₄ + C ₃ H ₆ O (9:1, v/v)	+	±	+	±	+	±	±	---	±	---
C ₆ H ₁₄ + CH ₃ CN (9:1, v/v)	+	±	+	±	+	±	±	---	±	---
DMSO + C ₃ H ₆ O (9:1, v/v)	+	+	±	+	±	±	±	---	±	---
DMSO + CH ₃ CN (9:1, v/v)	+	+	±	+	±	+	±	---	±	---
CHCl ₃ + CH ₃ CN (9:1, v/v)	+	±	+	±	+	±	±	---	±	---
CHCl ₃ + C ₃ H ₆ O (9:1, v/v)	+	+	±	±	±	±	±	---	±	---
C ₅ H ₁₁ OH + C ₃ H ₆ O (9:1, v/v)	+	±	+	±	±	±	±	---	±	---
C ₅ H ₁₁ OH + DMSO (9:1, v/v)	±	±	±	±	±	±	---	---	---	---

- **Solubility marks:** (+) soluble; (±) partially soluble; (- - -) insoluble

However, we observed the formation of the light fraction on the top of double layers, when extracted by hydrophobic solvents such as CHCl_3 , DMSO, and C_6H_{14} . We noticed that during the dissolution of BSFL fat in hydrophilic reagents, CH_3CN , CH_3OH , or $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{OH}$, the cloudy layer formed at the bottom of the organic solvent. During increasing of the fat concentration from 10% to 30% (w/v) revealed a decrease in the solubility of fat almost for every organic solvent, except for tetrachloromethane, pentanol, and a mixture of chloroform- dimethylformamide (9:1, v/v) as shown in Figure S1.

When we evaluated the antimicrobial efficacy of soluble or partially soluble fractions of BSFL fat, which obtained from the solubility assay, where all soluble or partially soluble fractions were tested against phytopathogenic bacteria, none of them demonstrated inhibition zones around the disk of 6 mm. Consequently, new developed extraction solution comprises of MQ water, methanol, and hydrochloric acid with ratio (90: 9: 1 % (v/v) used to extract the active molecules from BSFL fat at room temperature. The extraction solution nominated as acidic water methanol (AWM) solution, while the extract of BSFL fat nominated as acidic water methanol extract (AWME1). Furthermore, the extraction procedure repeated three time under the same condition and the three extracts were mixed together and nominated as AWME, then the antibacterial potency for the mixture of AWME was validated against phytopathogenic bacteria strains. In this study, for the first time, we used the *H. illucens* larvae fat manufactured through the direct pressing of the alive fly larvae (15 days old). High yield extract 4.43% of obtained from BSFL fat extraction, compared to 0.52% extracted by water [242] and 2% extracted using methanol [36]. However, HI larvae fat show significant solubility in single or combined non-polar organic solvents, but no activity was generated against phytopathogenic bacteria. On the other hand, a candidate AWM solution is able to extract bioactive molecules that were evaluated in the next experiments showing high activity against the same phytopathogens.

3.2. Inhibition zone diameter measurements using disk diffusion assay

The antibacterial effect of AWME from BSFL fat against five important phytopathogens *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 13951, *Pectobacterium astrosepticum* ATCC BAA-672D, *Pantoea agglomerans*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* were measured using the agar disk diffusion assay. The representative results of phytopathogenic bacterial growth inhibition of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 13951 and *Pectobacterium astrosepticum* ATCC BAA-672D during 12 h and 24 h of treatment (Table 2, Figure S2).

Table 2. Antibacterial susceptibility of AWME extract against phytopathogenic bacteria strains

AWME	Xcc		Pagg		Dsol		Pcc		Pba	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
50	23.5 ± 0.35	19.0 ± 0.28	15.4 ± 0.28	12.5 ± 0.7	18.5 ± 0.7	14.0 ± 0.7	20.25 ± 1.76	14.75 ± 0.35	14.75 ± 0.75	12.2 ± 0.56
25	16.5 ± 0.42	12.5 ± 0.7	10.5 ± 0.7	8.5 ± 0.35	14.2 ± 0.28	11.0 ± 0.7	13.25 ± 0.35	10.12 ± 0.18	12.25 ± 0.35	9.5 ± 0.7
12.5	12.0 ± 0.35	8.0 ± 0.7	9.3 ± 0.21	7.0 ± 0.0	11.0 ± 0.7	9.0 ± 0.7	8.25 ± 0.35	7.0 ± 0.0	9.12 ± 0.18	7.12 ± 0.18
6.25	7.25 ± 0.28	ND	8.0 ± 0.7	ND	9.0 ± 0.7	7.0 ± 0.0	7.25 ± 0.35	ND	7.37 ± 0.18	ND
3.13	ND	ND	7.0 ± 0.0	ND	7.0 ± 0.0	ND	ND	ND	ND	ND
P/S	23.75 ± 0.35	24.0 ± 0.35	20.75 ± 0.35	21.0 ± 0.7	23.75 ± 0.7	23.75 ± 0.7	21.12 ± 0.18	21.0 ± 0.7	21.0 ± 0.7	20.63 ± 0.53
AWM	7.0 ± 0.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Abbreviations: Xcc, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; Pagg, *Pantoea agglomerans*; Dsol, *Dickeya solani*; Pcc, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pba, *Pectobacterium atrosepticum*; ND, non-detectable; AWME, acidic water methanol extract from BSFL fat; AWM extraction solution.

AWME effectively inhibited bacterial growth for all tested *Xcc*, *Pagg*, *Dsol*, *Pcc*, and *Pba* pathogenic bacteria (Table 2). The AWME suppressed the growth of all phytopathogens in a dose-dependent manner in the range 50 to 3.13 mg/mL of tested concentrations (Table 2). Thus, the *Pagg* and *Dsol* strains were the most susceptible during 12 h of incubation to AWME treatment at minimal 3.13 mg/mL of its concentration. In contrast, for all other strains, the same effect was observed at 12.5 mg/mL of AWME concentration. The bacteria susceptibility to the AWME treatment decreased after 24 h of bacterial growth, compared with 12 h, as revealed in Figure S2 and Figure 7.

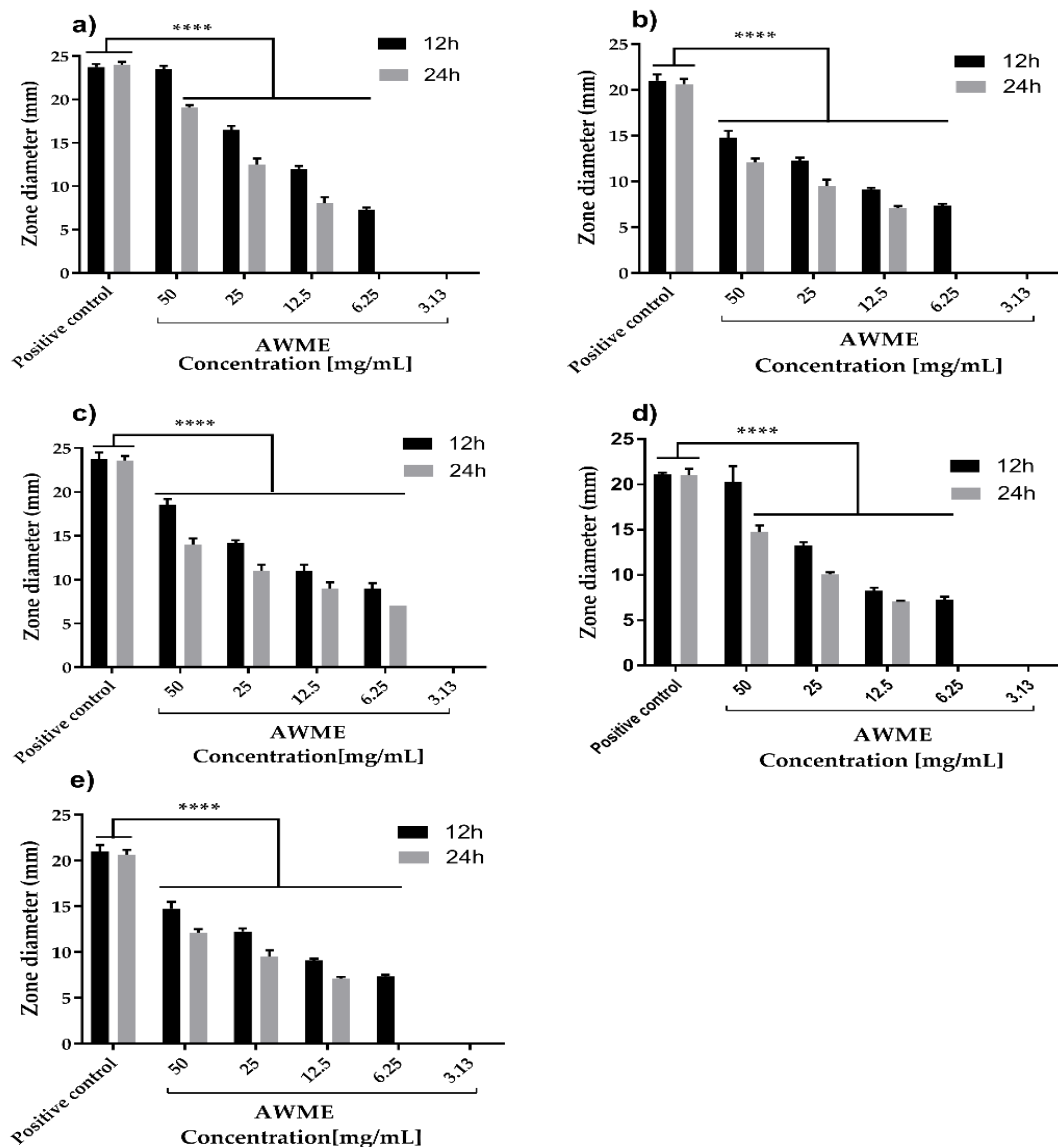


Figure 7. Agar disk diffusion test, antimicrobial efficacy of AWME against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (a), *Pantoea agglomerans* (b), *Dickeya solani* (c), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (d) and *Pectobacterium atrosepticum* (e) bacteria strains. The bacteria exposed to 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.13 mg/mL of extract from BSFL fat. The zone of bacterial growth inhibition measured after 12 h and 24 h of incubation at 28 ± 0.5 °C by the diameter of clear zone surrounding of the discs (in mm). Penicillin - streptomycin (p/s) used as an antibacterial positive control. All values are

represented as mean \pm SD, in triplicate ($n = 3$). Data were analysed by tow-way ANOVA, followed by Tukey Multiple Comparisons Test. Data represented as significant difference as compared to Positive control and ****P < 0.0001.

The IZD size after 12 h of incubation was the highest for Xcc strain (23.5 ± 035 mm) and lowest for the Pba strain (14.75 ± 0.75 mm) at 50 mg/mL of AWME concentration, while after 24 h it decreased to 19.0 ± 0.28 mm and 12.2 ± 0.56 mm, respectively. A decrease of AWME level in the range from 50 mg/mL to 3.13 mg/mL led to essential IZD size reduction during 12 h of incubation, compared with 24 h. Thus, for the most susceptible Xcc strain IZD size was decreased by 69.1% from 23.5 ± 035 mm to 7.25 ± 0.28 mm after 12 h of incubation, while after 24 h only by 57.0% from 19.0 ± 0.28 mm to 8.0 ± 0.7 mm. The slight fluctuation of IZD size between 20.63 ± 053 – 24.0 ± 0.35 mm for positive control penicillin/streptomycin at 5000 IU/mL to 5000 μ g/mL loads did not substantially change between 12 h and 24 h of incubation. All IZD caused by AWME compared to zone sizes of positive control (P/S) after 12 h, 24 h incubation (****P < 0.0001) as shown in Figure 7. These results indicated that chemical compounds extracted from *H. illucens* larvae fat using acidic water methanol extraction possess efficient antibacterial activity against five plant pathogens. Of note, extracted antimicrobial peptides (AMPs) from BSFL showed IZD lower size (15.0 mm) [243] in zone inhibition assay for Xcc during 24 h compared to our results of AWME antibacterial activity study. AMPs demonstrated an inhibitory effect against Gram-negative bacteria by IZD ranging from 9 to 13 mm [242].

3.3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of AWME extract

The MIC was determined in 96-microtiter plate based on turbidimetric assay and the MIC value was 0.78 mg/mL for all tested phytopathogens. In comparison, MIC for the positive control penicillin-streptomycin was 3.13 U/mL– μ g/mL for all strains, except Xcc, which recorded 6.25 U/mL– μ g/mL (Table 3).

Table 3. Antibacterial activity measured by MIC and MBC of AWME against phytopathogenic bacteria

Antibacterial agent	Activity	Concentration (μ g/mL)				
		Xcc	Paag	Dsol	Pcc	Pba
AWME3	MIC	780	780	780	780	780
	MBC	780	1560	780	780	780
Positive control (P/S)	MIC	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13
	MBC	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13

The MBC, which kills 99.9% of the bacteria, indicates the antimicrobial potency of AWME and it was determined based on the value of the MIC. MBC of AWME was 0.78 mg/mL for all phytopathogenic strains except Pagg, which was the less susceptible to AMWE with MBC 1.56 mg/mL. MBC of the positive control (P/S) was 6.25 U/mL– $\mu\text{g/mL}$ only for Xcc strain and 3.125 U/mL– $\mu\text{g/mL}$ for all other strains (Table 3). Besides, the BSFL extraction reagent (AWM reagent) further verified as vehicle control for its antibacterial capability within the same range of concentrations as used in the turbidimetric assay for AMWE. We found that AWM reagent does not affect all tested bacteria proliferation. These results indicate the AWME potency for bacterial growth inhibition, especially of such significant pathogens as *Pantoea agglomerans*, *Dickeya solani* and *Pectobacterium atrosepticum*. Our findings demonstrated that AWME seems to be more effective than AMPs, caffeine, and phytochemicals against actual phytopathogens. [243–245].

All the above-mentioned results prove the bactericidal capacity of AWME with high potency towards all tested phytopathogens. Of note, although the MICs of larval extract in our experiments (0.78 mg/mL/well) were higher than the MICs of standard antibiotic (3.13 U/mL–6.25 $\mu\text{g/mL}$ /well), the P/S antibiotic was composed of purified active ingredients, compared to the crude extracts of fly larvae [246]. Although MIC for lactic acid-D- methyl ester, extracted from an *Aloe vera*, was 93.75 $\mu\text{g/mL}$ against *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (Xcc), but the MBC was 1.5 mg/mL and besides, it was not effective against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (Pcc), compared to our findings [247]. Soberón *et al.* [248] declared that methanolic and the aqueous extract of *Ligaria cuneifolia* and *Jodina rhombifolia* leaf have the MICs ranging from 2.5 to 156 $\mu\text{g/mL}$ and 5 mg/mL, respectively, against Xcc, while these extracts were bacteriostatic. These findings demonstrate that AWME of BSFL fat characterized with bactericidal compounds that able to inhibit and eliminate all five phytopathogenic bacteria at low doses concentration.

3.4. Values of the 50% inhibitory concentration (MIC50) of AWME effective against the plant pathogenic bacteria

The effectiveness, as 50% inhibitory concentration (MIC50) values of AWME against the growth of pathogenic species Xcc, Pagg, Dsol, Pcc, and Pba were determined at the 6 h (early), 12 h (middle) and 24 h (late) post-infections based on the dose-response curve data from our previous turbidimetric assay (Table 4, Figure 8).

Table 4. MIC50 analysis for phytopathogens treated with AWME from fat vs. positive control (penicillin/streptomycin) for 6 h, 12 h, and 24 h.

Bacteria species	MIC50 ($\mu\text{g/mL}$) of AWME against treated bacteria			MIC50 ($\mu\text{g/mL}$) of positive control against treated bacteria		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
Xcc	535.1 \pm 0.16	477 \pm 0.25	485.4 \pm 0.4	1.941 \pm 0.15	1.844 \pm 0.26	1.893 \pm 0.36
Pagg	299.5 \pm 0.12	383.6 \pm 0.22	366.8 \pm 0.38	1.103 \pm 0.13	1.638 \pm 0.22	1.283 \pm 0.37
Dsol	451.8 \pm 0.07	455.1 \pm 0.2	441.8 \pm 0.36	1.060 \pm 0.1	1.675 \pm 0.19	1.306 \pm 0.35
Pcc	317.6 \pm 0.07	386.6 \pm 0.22	431 \pm 0.35	1.099 \pm 0.13	1.782 \pm 0.19	1.412 \pm 0.35
Pba	290.3 \pm 0.07	376.1 \pm 0.22	400.2 \pm 0.35	1.088 \pm 0.07	1.630 \pm 0.22	1.326 \pm 0.35

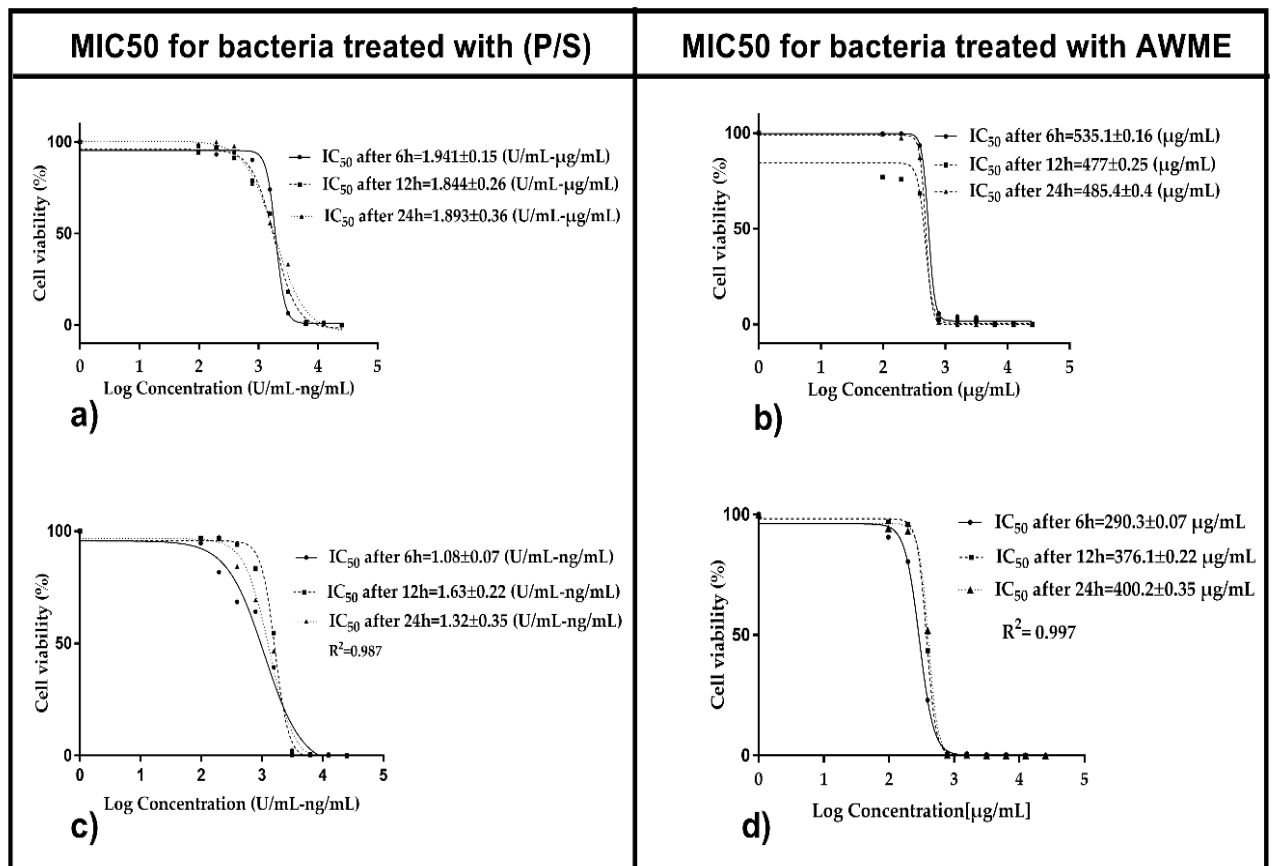
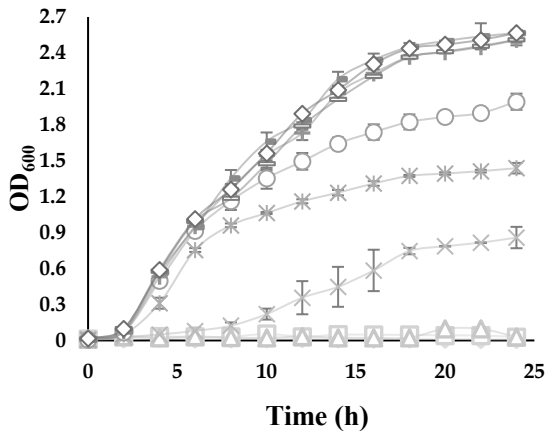
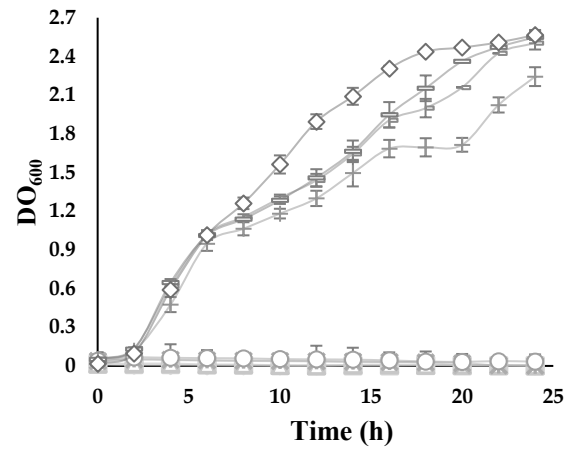


Figure 8. The MIC50 of plant pathogenic bacteria treated with AWME from larvae fat determined by turbidimetric assay data and compared with the positive control penicillin-streptomycin (P/S) results from the same experiment. Phytopathogenic cells viability at 6 h, 12 h and 24 h for **a)** *X. campestris* pv. *campestris* treated with (P/S), **b)** *X. campestris* pv. *campestris* treated with AWME, **c)** *Pectobacterium atrosepticum* treated with (P/S), **d)** *Pectobacterium atrosepticum* treated with AWME. MIC50 values calculated by using non-linear regression mode of Graph pad Prism7 software. Presented values are mean \pm standard error of the mean. IC₅₀ values expressed for bacteria treated with AMWE in the range (0-25000 $\mu\text{g/mL}$) and for positive control (P/S) in the range (0-25 U/mL- $\mu\text{g/mL}$). Each MIC50 value in the curve was an average of three independent experiments \pm standard deviation error mean (SEM).

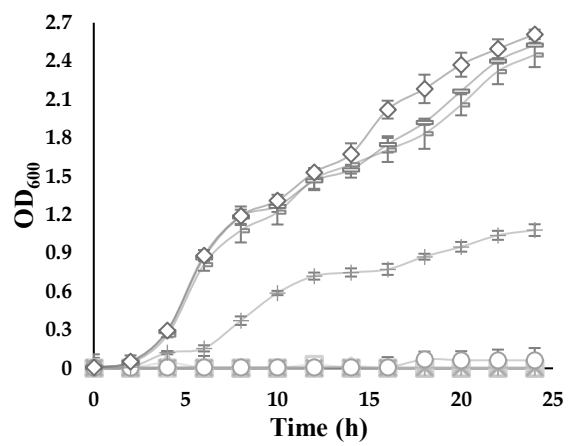
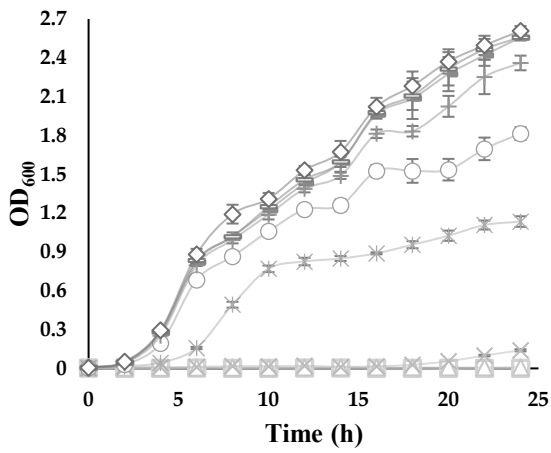
The MIC50 values indicated the highest resistance of *Xanthomonas campestris pv. campestris* strain to AWME and standard positive control (P/S) treatments as early as 6 h post-infection ($535.1 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$ and $1.941 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$, respectively). Interestingly, those MIC50 values of AWME and P/S for this strain retained the highest until the 24 h post-infection compared to all tested strains ($485.4 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ and $1.893 \pm 0.36 \text{ U/mL} - \mu\text{g/mL}$, respectively). On the other hand, the AWME showed the highest activity at 6 h and retained the highest during 24 h of monitoring against Pba and Pagg strains with MIC50 values equal to 290.3 ± 0.07 vs. 400.2 ± 0.35 and 299.5 ± 0.12 vs. $366.8 \pm 0.38 \mu\text{g/mL}$, respectively as shown in Figure 8. In addition, the AWME showed high stability and the ability to maintain the consistent responsiveness throughout 24 h of *Dickeya solani* strain treatment as seen by the similar MIC50 values (451.8 ± 0.1 , 455.1 ± 0.2 and $441.8 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$ at 6 h, 12 h, and 24 h, respectively). In contrast, all recorded MIC50 values of the standard positive control have fluctuated within all tested strains. These results conclude that proposed AWME from BSFL fat can prevent and sustainably inhibit the proliferation and growth of the plant pathogens as early as 6 h of incubation, thus having the potential to be used as an antibacterial agent against phytopathogenic bacteria compared to other extracts [242,249].

3.5. The potency of AWME from larvae fat on bacteria growth curves

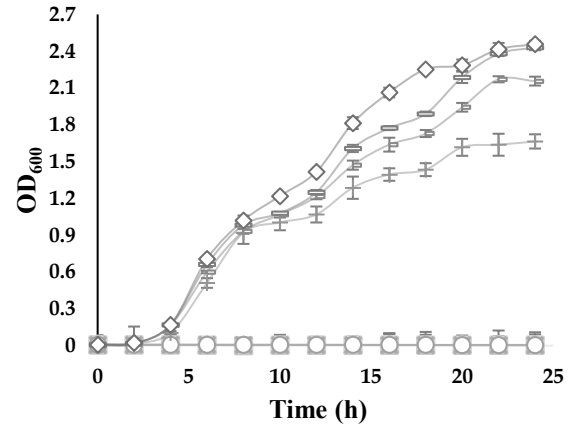
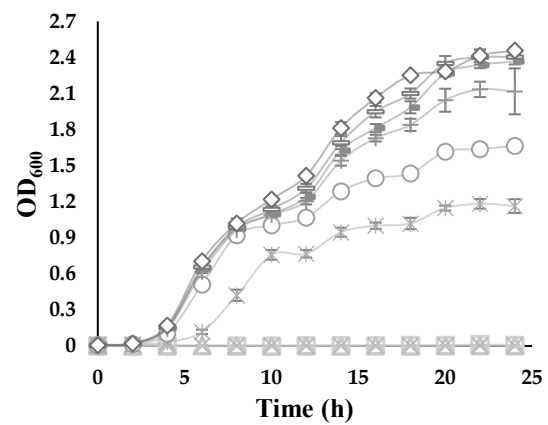
The growth curve assay plays a crucial role in antimicrobial agent validation to fight against phytopathogenic diseases [250]. The antimicrobial effects of AWME against plant pathogenic species Xcc, Pagg, Dsol, Pcc and Pba were further evaluated using turbidimetric (TB) assay in the range from 25 to 0.097 mg/mL of AWME concentration (Figure 9). TB assay results demonstrated the increase of the AWME antimicrobial efficacy in a concentration-dependent manner, similar to the one observed from the agar disk diffusion assay (Figure 7). The measuring of the optical density (OD) of the cell suspension at 600 nm within 24 h assessed the effect of AWME concentration on bacterial proliferation. As shown in Figure 9, in the presence of 0.39 mg/mL AWME, the bacterial proliferation was retarded for all strains throughout the experiment except Xcc strain, whose proliferation recovered after 20 h of incubation. We observed the difference in the rate of proliferation among tested and control groups in the late log phase. This trend continued at the stationary phase, when the cultures OD reached higher 2.4 for the control group, while the density among AMWE-treated bacteria was in the range of 1.07 to 1.5 OD₆₀₀. Besides, the presence of AWME at 0.39 mg/mL concentration delayed the lag phase time up to 6 h for Pagg, Pba, and Pcc strains, except Xcc (Figure 9).

Bacteria proliferation
in the (P/S) presenceBacteria proliferation
in the AWME presence

(a)



(b)



(c)

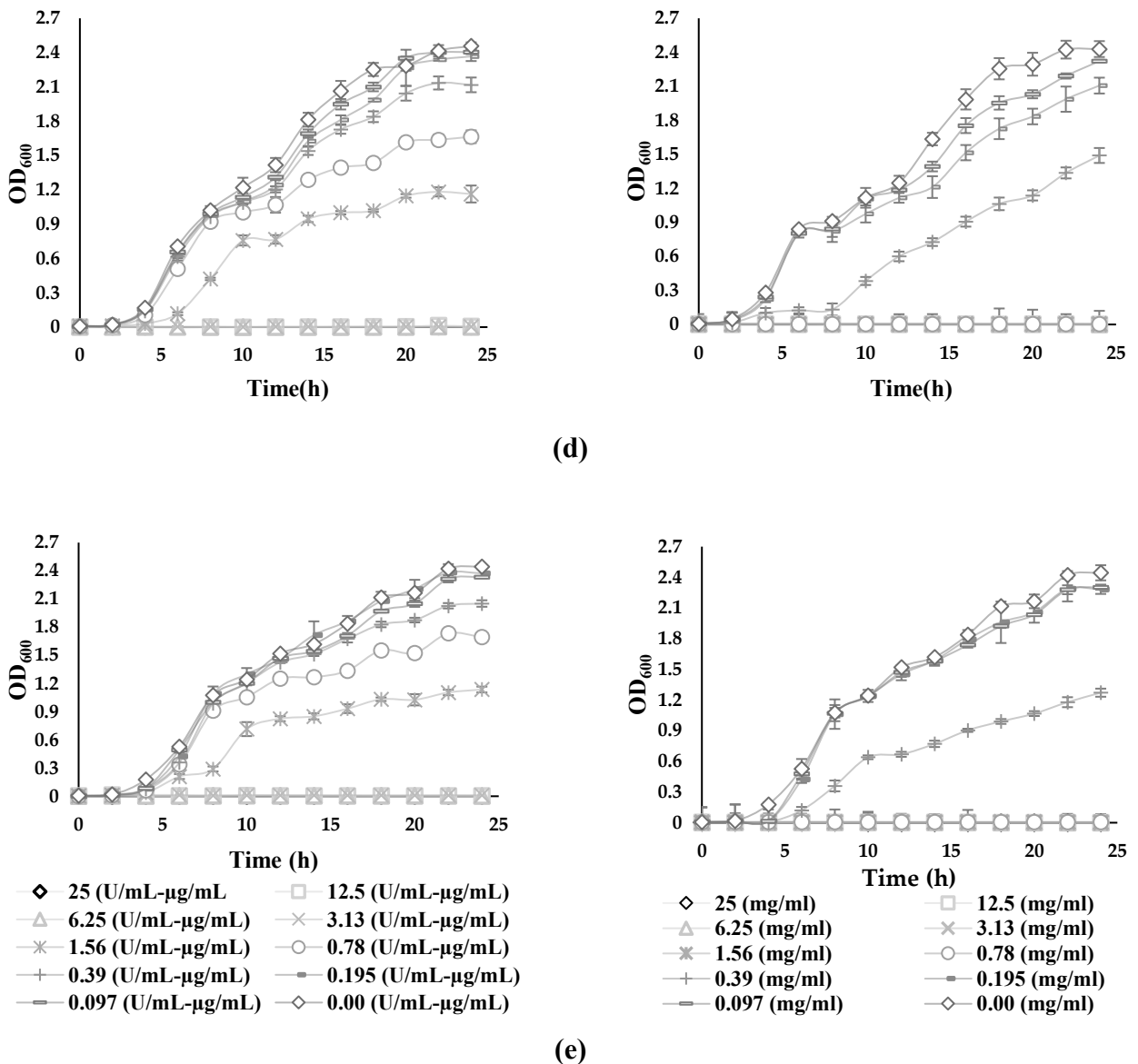


Figure 9. The turbidimetric assay performed in the sterile 96-well plates, in the range of 25 to 0.0097 mg/mL of AWME and 25 to 0.0097 μ g/mL P/S concentrations, in triplicates. Five bacteria strains tested: (a) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; (b) *Pantoea agglomerans*; (c) *Dickeya solani*; (d) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, and (e) *Pectobacterium atrosepticum*. Each value represents the mean of three independent experiments \pm SD ($n = 3$). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3.6. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of AWME extract

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) is advanced technique used to investigate compounds by using retention times of relative gas chromatography, further separation of the mixture components in combination with the mass spectral fragmentation patterns, which refers to the chemical structures of the detected compound [251,252]. GC–MS has the priority to analyse fatty acids since it has well-established databases used in fatty acids identification,

further it has higher selectivity and more efficiency, and provide more structural information [253,254]. The number and position of unsaturated double bonds in FAs can easily be detected via routine basis in GC-MS [74]. The GC-MS analysis of AWME was performed to identify the bioactive molecules abundant in AWME that was extracted from BSFL fat. The identified organic compounds in the AWME of larvae fat were 34 (Figure 10). The chemical profile of these compounds was determined based on the National Institute of Standards and Technology (NIST, USA) database. After comparing the mass spectrum of the unknown AWME components with the range of the known chemicals from NIST library, the similarity of GC-MS spectrums more than 70% was considered as the main criteria for that selection.

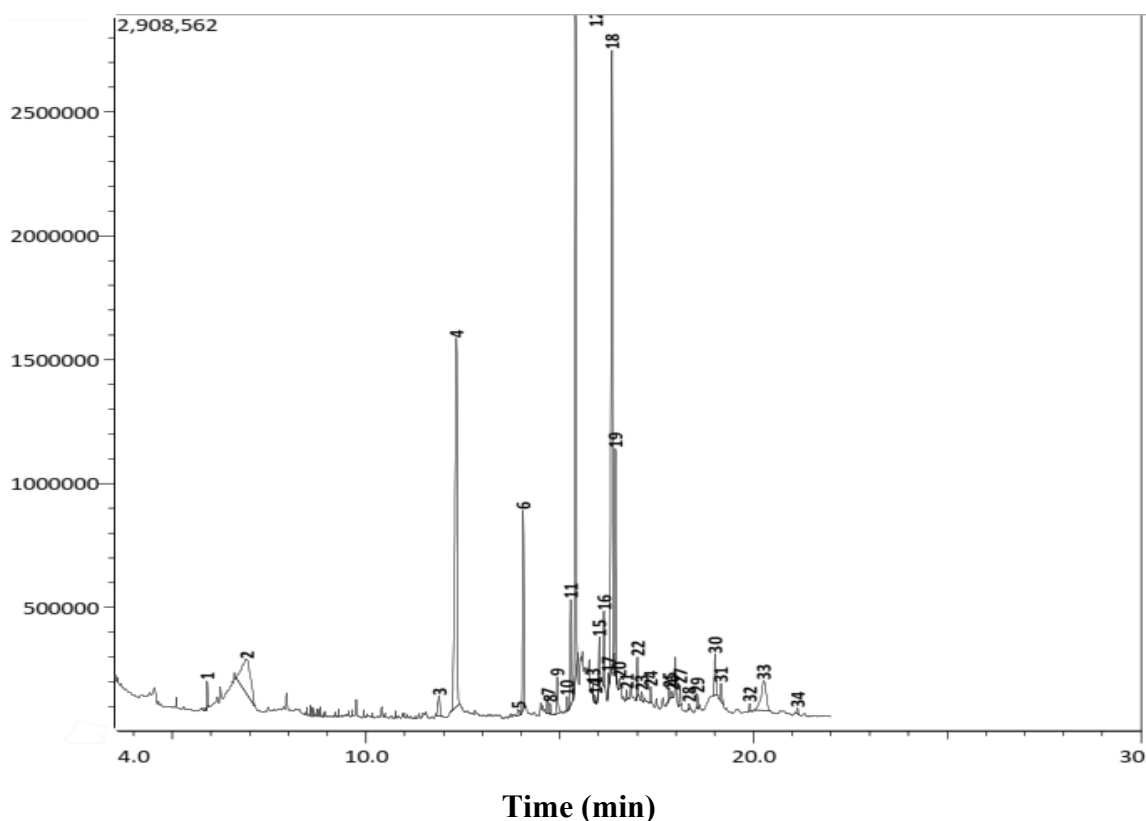


Figure 10. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) chromatogram of AWME from BSFL fat. The chemical identity of 34 compounds from AWME fat detected by GC-MS was determined based on NIST Library of chemical compounds.

Among 13 dominant (>1%) organic compounds, the three most abundant represented more than 50% of the content, i.e., 22.22% of octadec-9-enoic acid (18:1, syn. oleic acid), 20.34% of n-hexadecanoic acid (16:0, syn. palmitic acid), and 18.48% of dodecanoic acid (12:0, syn. lauric acid) (Table 5). The other compounds were presented in trace amount (less than 1%), but possessed interesting biological activity and remained as subjects of our further study. Only the highly presented extract (\geq 1%) compounds, or the ones characterized in the literature by antimicrobial capacity, were chosen for the final analysis (Table 5).

Table 5. Chemical content of AWME from BSFL fat

Peak Number	Retention Time	Content (%)	Compound Name (NIST Library)	Chemical Formula	Molecular Weight (g/Mol)	Similarity (%)
1	5.9	0.61	1,2-Propanediol, 3-chloro	C ₃ H ₇ ClO ₂	110	93
2	6.92	6.88	1,2,3-Propantriol	C ₃ H ₈ O ₃	92	97
3	11.888	1.02	beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro	C ₆ H ₁₀ O ₅	162	92
4	12.335	18.48	Dodecanoic acid (lauric acid)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200	97
5	13.335	0.3	2,4-Dodecadienal, (E, E)- (aromatic substance)	C ₁₂ H ₂₀ O	180	80
6	14.059	5.59	Tetradecanoic acid (myristic acid)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	97
7	14.682	0.41	Dodecanoic acid, ethenyl ester (lauric acid vinyl ester)	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226	81
8	14.753	0.24	Pentadecanoic acid (saturated fatty acid)	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	83
9	14.937	1.17	3-Cyclopentylpropionic acid, 2-dimethylaminoethyl ester	C ₁₂ H ₂₃ NO ₂	213	91
10	15.186	0.35	Hexadecanoic acid methyl ester (palmetic acid methyl ester)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	88
11	15.286	3.02	cis-9-Hexadecenoic acid (palmetoleic acid)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	96
12	15.412	20.34	n-Hexadecanoic acid (palmetic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	96
13	15.858	0.18	Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	C ₁₅ H ₃₀ O ₄	274	73
14	15.918	0.14	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	78
15	16.02	1.32	Dodecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester (monolaurin)	C ₁₅ H ₃₀ O ₄	274	83
16	16.138	1.62	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (oleic acid methyl ester)	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	87
17	16.257	0.34	Octadecanoic acid, methyl ester (stearic acid methyl ester)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	86
18	16.347	22.22	Octadec-9-enoic acid (oleic acid)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	95

19	16.437	5.34	Octadecanoic acid (stearic acid)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	94
20	16.537	0.27	Linoleic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	75
21	16.721	0.23	9,12-Octadecadienoic acid (Z, Z)- (linoleic acid)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	89
22	17.002	0.97	Fumaric acid, 2-dimethylaminoethyl heptadecyl ester	C ₂₅ H ₄₇ NO ₄	425	82
23	17.114	0.24	Tetradecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₄	304	86
24	17.346	0.36	Eicosanoic acid (Arachidic acid)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	92
25	17.821	0.35	Octanoic acid, 2-dimethylaminoethyl ester	C ₁₂ H ₂₅ NO ₂	215	87
26	17.902	0.15	cis-9-Hexadecenal	C ₁₆ H ₃₀ O	238	83
27	18.1	0.51	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330	94
28	18.336	0.15	9-Octadecanoic acid (Z)-	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	83
29	18.551	0.33	Tetradecanamide	C ₁₄ H ₂₉ NO	227	91
30	19.011	1.45	9-Octadecenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester, (E, E, E)-	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	884	93
31	19.162	0.68	Oleoyl chloride	C ₁₈ H ₃₃ ClO	300	90
32	19.905	0.22	Octadecanamide	C ₁₈ H ₃₇ NO	283	92
33	20.262	3.52	Dodecanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester	C ₃₉ H ₇₄ O ₆	638	85
34	21.134	0.2	Cholesterol, pentafluoropropionate	C ₃₀ H ₄₅ F ₅ O ₂	532	88

The composition of lipids in BSFL varies depending on the method of larvae processing that can yield various fatty acids (FAs) profile [37]. The larvae's lipid profile is mainly rich in lauric, myristic, palmitic, oleic, capric, linoleic, and other medium-chain fatty acids. Thus, myristic acid has a broad spectrum of antibacterial effects [30], larvaecidal and repellent activities [35]. Several studies documented that BSFL consider a sustainable reservoir of antimicrobial compounds, in particular fatty acids [36,42,125,255,256].

The FAs profile identified by GC-MS analysis, and presented in Table 5. In larvae fat extract, it was found 22.22% oleic and 3.02% palmetoleic monounsaturated FAs, also 20.34% palmitic, 18.48% lauric, 5.59% myristic, 5.34% stearic mono saturated FAs with the similarity index 96%, 97%, 97%, and 94%, respectively. The poly saturated fatty acid (e.g., eicosanoic acid (arachidonic acid) and polyunsaturated fatty acids (e.g., cis, cis-9, 12-Octadecadienoic acid (Z, Z) (linoleic acid)) were present in trace amount, 0.36% and 0.23%, respectively.

The more abundant amount of the saturated fatty acids compared to unsaturated identified in AWME was consistent with results published by Ushakova *et al.* [45]. They supposed that fatty acids in BSFL serve as energy storage. The amount of saturated fatty acids prevailed because these chemicals are less subjected to oxidation than unsaturated fatty acids. Our GC-MS analysis indicates the most abundant constituents of AWME, that confirmed the major FAs were saturated FAs and ordered in percentage scale, as shown in Table5. Ewald *et al.* [257] reported, that from total amount of fatty acids in the larvae the major present filled up by lauric (C12:0), palmitic (C16:0) and oleic (C18:1 n-9) acids (52%, 12–22%, and 10–25%, respectively). Our study revealed the much higher fatty acids profile and it was shown, based on our method of extraction, that we were able to extract from BSFL larvae fat 22.22% of the oleic (C18:1 n-9), 20.34%, of palmitic (C16:0) and 18.48% of lauric acid (C12:0) (Table 5). Although several reports [18,32,33,258] showed the different amount of lauric acid, palmitic and oleic acid, it is generally accepted that the variable percentages of FAs mainly depend on the sort of insects rearing substrate.

On the other hand, the awareness to reduce the use of the chemical pesticides by developing the alternative strategies or technologies to improve plant disease resistance and control of pathogens is highly promoted. There was growing interest in the research focused on the alternative pesticides and antimicrobial active compounds, including the plant extracts and essential oils of aromatic plants [259]. Under certain conditions, *de novo* mutations and selection can develop in pathogenic bacteria during one minute to hours, leading to the resistance genes arising, resulting in bacteria resistance to a single antibiotic [260]. Discovered FAs play a very crucial role in increasing resistance of plants to phytopathogens. Thus, linoleic acid found to induce systemic resistance of tobacco against the bacterial soft rot pathogen caused by *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc) [261]. The lauric acid (LA) possessed the most potent activity to inhibit the growth of Gram-positive bacteria. Its

monoglyceride derivative (glycerol monolaurate, (G ML)) exhibited even more vigorous inhibitory activity than LA [100]. Importantly, both LA and G ML are abundant in nature. They are recognized as safe by the Food and Drug Administration (FDA) in USA and exhibited full anti-infective applications, including several applications such as in agriculture [262].

The linoleic acids were phytotoxic and effective in inducing systemic resistance. In contrast, oleic acid was the least phytotoxic and caused no systemic resistance [263]. According to Blechert *et al.* [264], the octadecanoic acid (stearic acid) derivative, octadecatrienoic acid, (Z, Z)-methyl ester play an important role in plant defence mechanism. The plant contains linoleic acid eliciting induced systemic resistance against phytopathogens. When a primary wound occurs in the plant, oligo-galacturonides signals formed, which activate octadecanoate to produce jasmonic acid, and which finally leads to the activation of the defense gene [265]. The hexadecanoic acid ethyl ester acts as antioxidant, nematicide, and pesticide. Furthermore, it may contribute to the antimicrobial and antioxidant activities [266]. As demonstrated in the present study, AWME of *H. illucens* larvae fat contains oleic, palmitic, lauric, myristic, stearic, and palmitoleic acid, which are saturated and unsaturated FAs having significant inhibition effect against bacteria that are in consistent with the activity of FAs, reported by other authors (Table 6).

Table 6. The content and published biological activity of major constituents of AWME of *H. illucens* larvae fat

Name of compound	Content (%)	Biological activity
Octadec-9-enoic acid (oleic acid)	22.22	Antibacterial [267]
n-Hexadecanoic acid (palmitic acid)	20.34	Antimicrobial [268]
Dodecanoic acid (lauric acid)	18.48	Antibacterial [269]
Tetradecanoic acid (myristic acid)	5.59	Antibacterial [30]
Octadecanoic acid (stearic acid)	5.34	Antimicrobial [270]
cis-9-Hexadecenoic acid (palmitoleic acid)	3.02	Antibacterial [271]
1,2,3-Propantriol	6.88	Antimicrobial and antiseptic
Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	0.51	Antimicrobial
cis-9-Hexadecenal	0.15	Antimicrobial [272]
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (oleic acid methyl ester)	1.62	Antimicrobial [273]
Dodecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester (monolaurin)	1.32	Antimicrobial [274]
Eicosanoic acid (arachidic acid)	0.36	Antibacterial, antifungal, antioxidant [275,276]
Hexadecanoic acid methyl ester (palmitic acid methyl ester)	0.35	Antibacterial and antifungal [277]
Octadecanoic acid, methyl ester (stearic acid methyl ester)	0.34	Antimicrobial [278]
9,12-Octadecadienoic acid (Z, Z)-(linoleic acid)	0.23	Antibacterial [279]

Chapter 4. Sequential extracts of *H. illucens* larvae fat eradicate pathogenic fish bacteria

4.1. Antibiotic susceptibility testing

Aeromonas spp., can acquire antimicrobial resistance mechanisms via several routes; it is a candidate for indicator bacteria to follow antimicrobial resistance dissemination in aquatic environments. To study the antimicrobial susceptibility, clinicians and epidemiologists/microbiologists have two different approaches: clinicians focus on the tryptic microorganism/antibiotic/host and others on the pair microorganism/antibiotic to recognize microorganisms as wild type or non-wild type, meaning for absence or presence of any acquired and mutational resistance mechanism to the drug in question. Thus, epidemiologists/microbiologists explored the evolution or emergence of bacterial populations displaying resistant traits, regardless of any therapeutic outcome. Unfortunately, to date, interpretation criteria for *Aeromonas* spp., for antimicrobial susceptibility tests are scarce in the literature. Epidemiological Cut-off Values (ECVs) or ECOFFs, the interpretive criteria called by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), were obtained from different laboratories and represent the upper limit of the MIC data distribution of fully susceptible (wild type) strains. Among *Aeromonas*, ECVs are available only for the species *A. salmonicida* regarding florfenicol, trimethoprim-sulfadimethoxine, oxytetracycline, and oxolinic acid either MICs or for Inhibition Zone Diameter (IZD) obtained by disk diffusion and for gentamicin, erythromycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole (only IZD) [280]. Whereas antibiotic susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas* has been extensively studied, less is known about environmental strains and particularly those from fish. Therefore, we first tested the susceptibility of two major fish pathogens for IZD by disk diffusion assay.

The resistance of fish pathogenic strains *A. salmonicida* and *A. hydrophila* to the standard antimicrobial agents represented eight classes of commonly used antibiotics (Figure S3 and Table 7) using the inhibition zone diameters measurements at 12 h and 24 h of incubation and categorized by the comparison with the measures of the CLSI breakpoints [280].

Table 7. Susceptibility (IZD) of *Aeromonas* spp., to antibiotics

IZD (mm)							
Antibiotic	<i>A. hydrophila</i>		<i>A. salmonicida</i>		Breakpoint (mm)		
	12 h	24 h	12 h	24 h	R	I	S
G	16.4 (S)	16.2 (S)	17.33 (S)	17.1 (S)	≤12	13–14	≥15
Ch	22.68 (S)	22.18 (S)	25.15 (S)	22.58 (S)	≤12	13–17	≥18

K	24.65 (S)	24.08 (S)	27.48 (S)	26.1(S)	≤13	14–17	≥18
Dox	22.7 (S)	22.1 (S)	13.8 (R)	10.7 (R)	<17	17–18	≥19
P/S	12.75 (I)	12.2 (I)	13.88 (I)	13.87 (I)	≤11	12–14	≥15
CT	10.53 (I)	10.4 (I)	9.23 (R)	8.78 (R)	≤10	-	≥11
RD	14.08 (R)	11.85 (R)	14.93 (R)	12.93 (R)	≤16	17–19	≥20
E	12.63 (R)	10.33 (R)	12.78 (R)	12.53 (R)	≤13	14–22	≥23
VA	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	-	-	≥15
P	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	≤28	-	≥29

Abbreviations: G, gentamicin; Ch, chloramphenicol; K, kanamycin; Dox, doxycycline; P/S, penicillin-streptomycin; CT, colistin; RD, rifampicin; E, erythromycin; VA, vancomycin; P, penicillin; R, resistant; I, intermediate; S, susceptible; (0), means no inhibition zone around the disc on the plate; (-), not determined

Ten antibiotics of eight different chemical groups used at concentration, recommended by production company including: (1) aminoglycosides-penicillin/streptomycin (P/S, 100 U/mL–100 µg/mL/disk); kanamycin (K, 1000 µg/disk); gentamicin (G, 200 µg/mL/disk); (2) tetracyclines-doxycycline (Dox, 100 µg/mL/disk); (3) phenicols-chloramphenicol (Ch, 1000 µg/mL/disk); (4) penicillin (P, 2U/disk); (5) glycopeptides-vancomycin (VA, 5 µg/disk), (6) macrolides-erythromycin (E, 60 µg/disk); (7) ansamycins: rifampicin (RD, 15 µg/disk), and (8) lipopeptides-colistin (10 µg/disk). Both tested *A. hydrophila* and *A. salmonicida* strains demonstrated bacteria multidrug-resistant capacity (MDR). *A. salmonicida* was more resistant than *A. hydrophila* against six different groups of antibiotics, including penicillin, vancomycin, erythromycin, doxycycline, rifampicin, and colistin. *A. hydrophila* was moderately sensitive to colistin (CT) and resistant to doxycycline (Dox). Of note, both strains were 100% resistant to penicillin and vancomycin without visible IZD zone around the antibiotics disks. The intermediate sensitivity to penicillin-streptomycin (P/S) was observed for both strains. Thus, *A. salmonicida* was resistant to 60% while *A. hydrophila* was resistant 50% of the total ten antibiotics used in this test. Interestingly, treatment with rifampicin, erythromycin, and chloramphenicol showed the sharpest decreasing IZD after 24 h of incubation at *A. hydrophila* and *A. salmonicida* strains (Table 7, Figure S3). In this regard, our data significantly complement and corroborate with a previous study [281] of the antibiotic sensitivity of the same bacteria genus (*Aeromonas* spp.) that also observed resistant to ampicillin.

The measurement of IZD at 12 h and 24 h demonstrated the decrease by the time of zone inhibition diameter caused by various antimicrobial drugs. Interestingly, treatment with rifampicin, erythromycin, and chloramphenicol showed the sharpest decreasing IZD after 24 h incubation at *A. hydrophila* and *A. salmonicida* strains, as indicated in Table 7 and Figure S3. Although antibiotics are used broadly to manage and control fish diseases, but many issues confirmed that they threat human, animal, and aquatic environments [282,283]. According to these results, doxycycline as a positive control appeared to be

more susceptible to *A. hydrophila*, while *A. salmonicida* exhibited high resistance to doxycycline, compared to AWME3; both strains were susceptible to AWME3. Tetracycline and its derivatives, such as doxycycline and oxytetracycline, are the most threatening antibiotics group in the ecosystem. They are commonly used in aquaculture to treat bacterial fish diseases such as vibriosis, flavobacteriosis, and erythrodermatitis. On the other hand, this antibiotic is hardly removed from wastewater treatment plants and is known for its non-target effects in aquatic environments. In addition, it exerts genotoxic effects in rainbow trout through the induction of DNA damage and chromosome breaks during acute and chronic exposure. At low concentrations 20–200 mg/L, it affects haematological markers such as haemoglobin, haematocrit, and red blood cell count, as well as the activity of enzymes such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and dehydrogenase (LDH), in carp. Moreover, it causes DNA damage in erythrocytes when exposed to juvenile tilapia at an environmentally relevant concentration of 4 µg/L. It is proved that doxycycline or oxytetracycline can delay hatching when exposed to zebrafish embryos with an EC₅₀ of 127.6 mg/L. Doxycycline also caused intestinal damage with inflammatory responses, and prolonged exposure (0.1–10,000 µg/L) caused alteration in swimming pattern and affected the intestinal bacterial community along with oxidative problems in zebrafish. Doxycycline proved to cause changes in the intestinal morphology and microbiota in tilapia species [282].

4.2. Sequential extraction of BSFL fat

As we demonstrated in our previous work, the bioactive compounds from AWME extract received using our developed protocol of BSFL fat extraction demonstrated a high level of antimicrobial activity against a broad spectrum of bacterial phytopathogens [31]. In attempt to improve the extraction procedure, we applied three rounds of sequential extractions of the same biomass of BSFL fat using the same protocol based on acidic water–methanol extraction solution 90:9:1 (v/v) in order to get the set of sequential extracts (SEs) named as AWME1, AWME2, and AWME3 (Figure 11). The total amount of bioactive compounds for each SE obtained 60 mg, 40 mg, and 30 mg for AWME1, AWME2, and AWME3, respectively. The yield of consecutive SEs corresponds to 2%, 1.33%, and 1% for AWME1, AWME2, and AWME3, respectively, out of the initial 3 g of larvae fat.

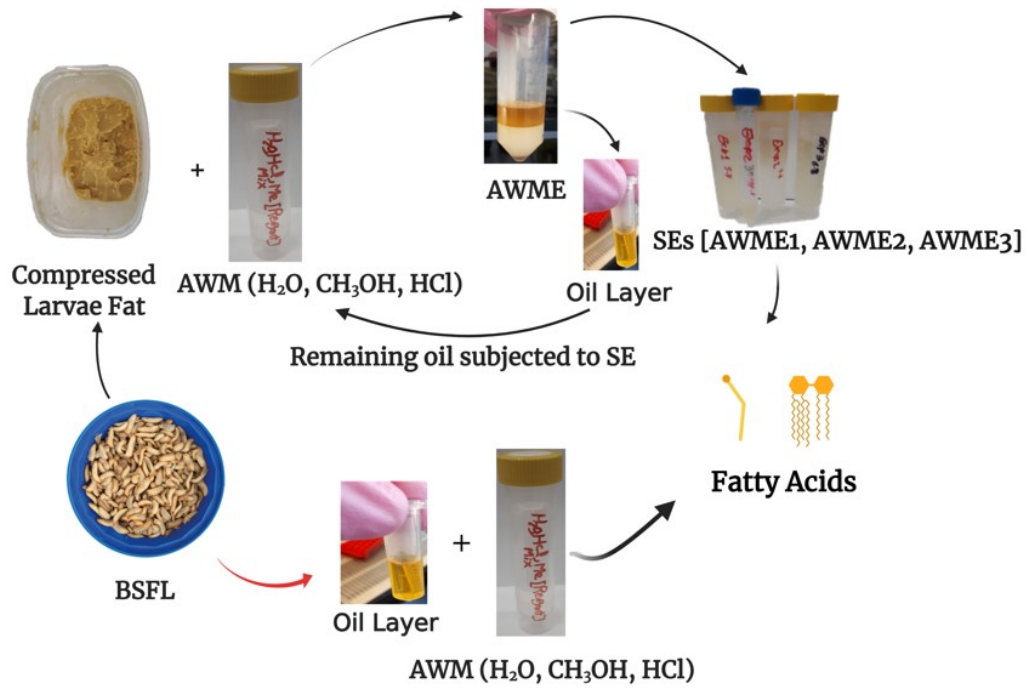


Figure 11. SEs stages of antibacterial compounds isolation procedure from *H. illucens* larvae fat.

4.3. Antibacterial susceptibility testing of *Aeromonas* spp. to SEs treatments

The antibacterial activity of SEs was determined separately for each extract using the inhibition zone diameters measurements at 12 h and 24 h of incubation. In addition, we assessed the mixture of three equal volumes of SEs adjusted to the same 40 mg/mL final concentration. IZD around the discs loaded with AWME1, AWME2, and AWME3 and a mixture of them are shown in Figure 12.


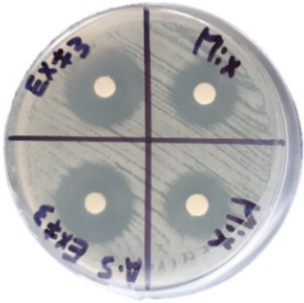
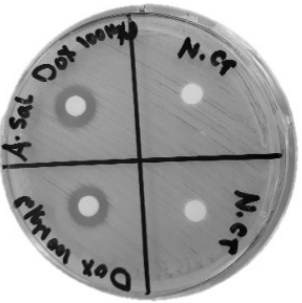

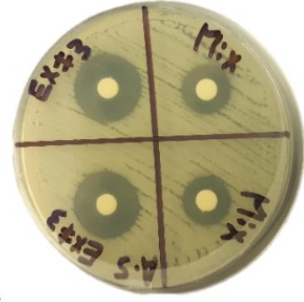

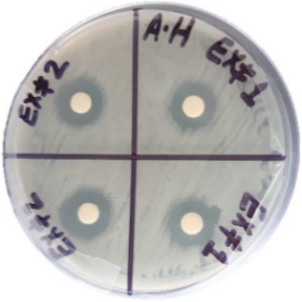
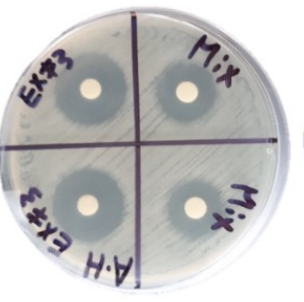
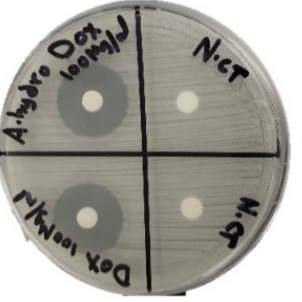
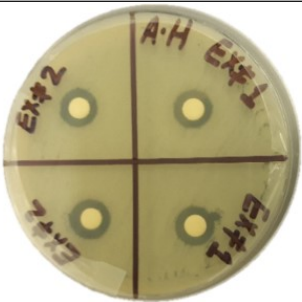
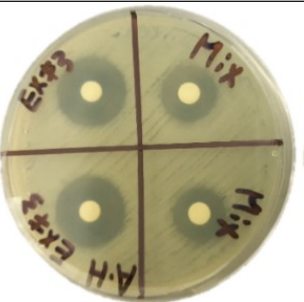

Time	<i>A. salmonicida</i>		
12h			
	a)	b)	c)
24h	<i>A. salmonicida</i>		
			
	a)	b)	c)
12h	<i>A. hydrophila</i>		
			
	a)	b)	c)
24h	<i>A. hydrophila</i>		
			
	a)	b)	c)

Figure 12. Susceptibility of *A. hydrophila* and *A. salmonicida* to three sequential extracts treatment determined by disk diffusion assay. Disks loaded in duplicates with 50 μ L of (a) AWME1 (Ex#1) and

AWME2 (Ex.#2); (b) AWME3 (Ex.#3) and a mixture of the three SEs (Mix) at concentration 40 mg/mL; (c) Positive control (Doxycycline, 100 μ g/mL) and the extraction reagent as a negative control (N.ct).

Inhibition zone diameter ranged from 11.4 ± 0.14 mm to 12.72 ± 0.22 mm for AWME1, while AWME2 recorded 11.95 ± 0.37 mm, 12.7 ± 0.22 mm against *A. hydrophila* and *A. salmonicida*, respectively, by 24 h of incubation at concentration 40 mg/mL. IZD caused by AWME1 was lower significant (** $p < 0.0047$) than other SEs (AWME2, AWME3) at 12 h of incubation time against *A. salmonicida* as shown in Figure 13. The inhibition zone diameter caused by AWME3 was significantly higher (**** $p < 0.0001$) than for all other sequential extracts after 12 h and 24 h of incubation, as illustrated in Figure 13. The AWME3 demonstrated the most significant inhibition zone with sizes 21.47 ± 0.14 mm, 20.83 ± 0.22 mm against *A. hydrophila* and *A. salmonicida*, respectively, by 24 h of incubation. The activity of the mixture of three extracts was lower than that of AWME3 alone. Notably, whereas the susceptibilities of *A. hydrophila* to AWME3 and doxycycline (the recommended positive control) were almost equal, the *A. salmonicida* was significantly (**** $p < 0.0001$) more susceptible to AWME3 compared to the positive control. Our data demonstrated that the sequential extraction procedure gradually enhanced the antimicrobial activity SEs against the pathogenic fish bacteria.

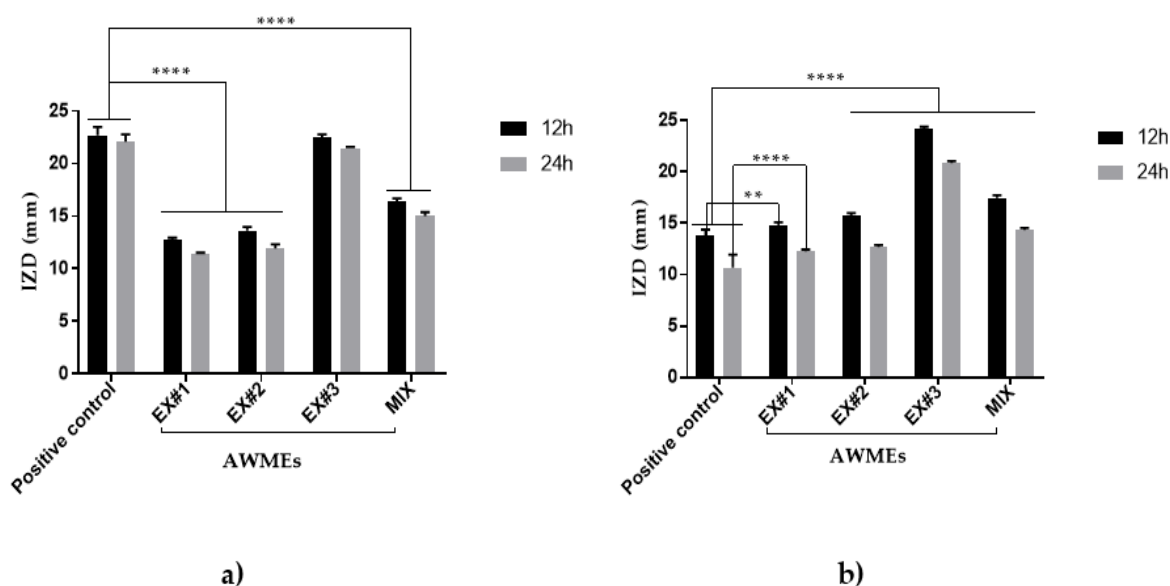


Figure 13. Susceptibility of (a) *A. hydrophila* and (b) *A. salmonicida* bacteria strains to various SEs measured by Disk diffusion assay. The bacteria subjected to AWME1 (Ex#1), AWME2 (Ex#2), and AWME3 (Ex#3), respectively, and a mixture of three extract (Mix) adjusted to the same 40 mg/mL concentration. The IZD values calculated after 12 h and 24 h of incubation at 26 °C by measuring the diameter of inhibition zones (IZD) surrounding of the discs (in mm). Doxycycline (Dox) 100 μ g/mL used as a recommended antibacterial positive control. All values are represented as mean \pm SD, in triplicate (n = 3). All results analysed by two-way ANOVA, followed by Tukey Multiple Comparisons Test. Data represented as a significant difference when it was compared with the positive control, and p -value < 0.05 .

4.4. AWME3 demonstrates dose-dependent antimicrobial activity

Various concentrations of AWME3 were tested against both *A. hydrophila* and *A. salmonicida* strains (Figure 14), and the resulted IZD values are presented in Figure 15.

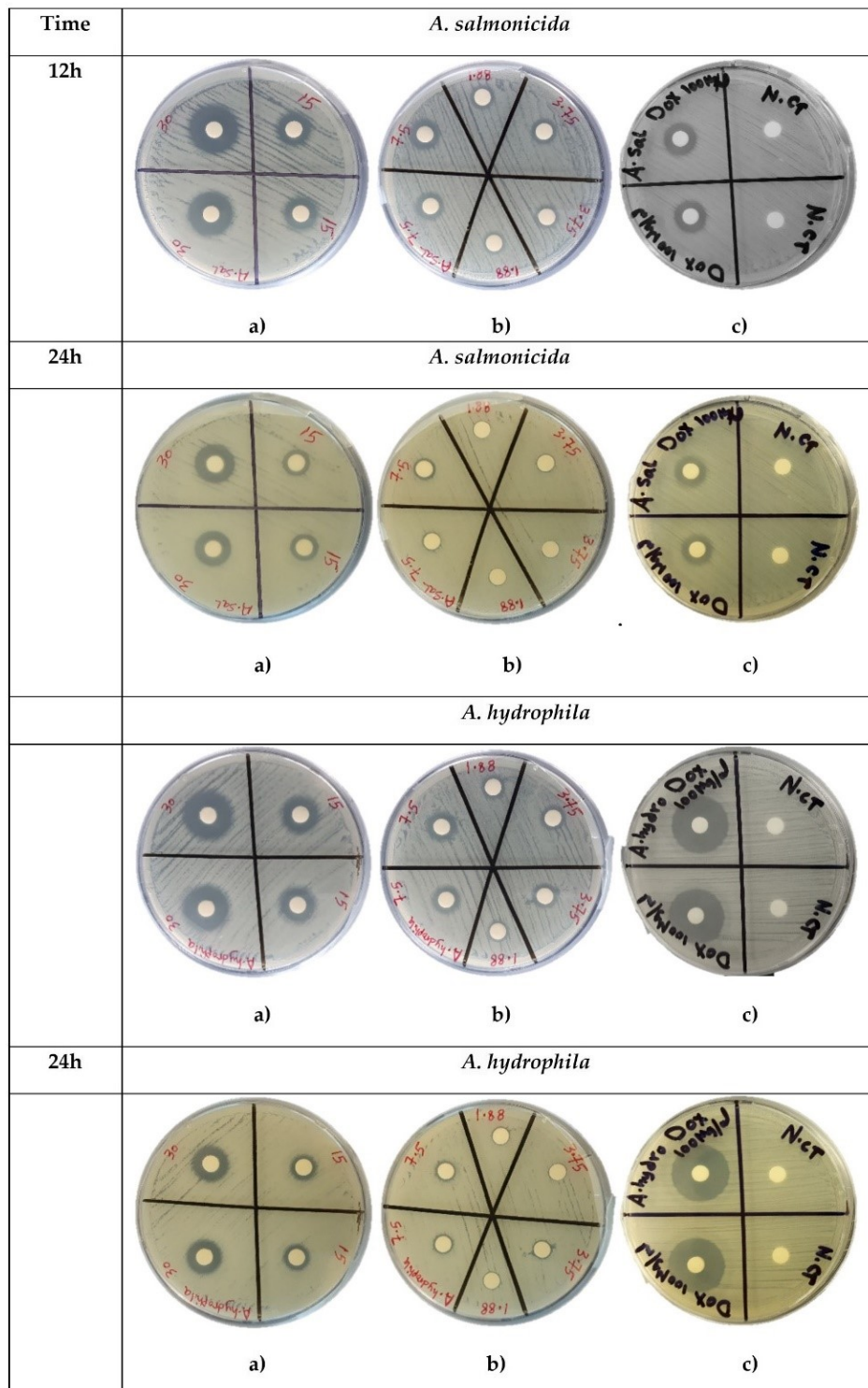


Figure 14. Dose-dependent susceptibility of *A. hydrophila* and *A. salmonicida* determined by disk diffusion assay of the AWME3. (a, b) IZD formed around the disks loaded with AWME3 at tested concentrations in the range of 1.88–40 mg/mL after 12 h and 24 h of incubation; (c) Positive control

(Doxycycline 100 µg/mL) and negative control (extraction solution of AWM mixture, N.ct) determined at 12 h and 24 h of incubation. Mean IZD for each condition recorded in three independent experiments.

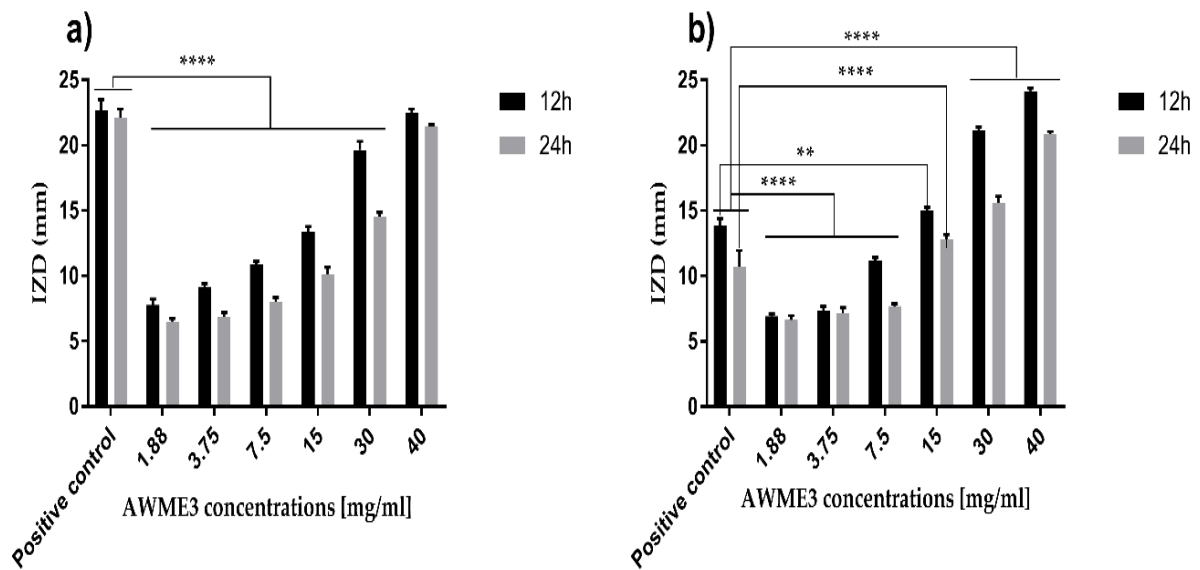


Figure 15. Susceptibility of *A. hydrophila* (a) and *A. salmonicida* (b) determined by disk diffusion assay of AWME3 (the third sequential extract) of BSFL fat. The bacteria strains were subjected to concentrations of 1.88, 3.75, 7.5, 15, 30, and 40 mg/mL of AWME3 from BSFL fat. The IZD were measured after 12 h and 24 h of incubation at 26 °C by measuring IZD surrounded of the disks. Doxycycline (Dox) used as the recommended positive antibacterial control. All values are represented as mean \pm SD of three ($n = 3$) independent experiments. Data were analysed by two-way ANOVA, followed by Tukey Multiple Comparisons Test. Data represented as significant difference as compared to positive control, and p -value was < 0.05 .

Dose-dependent susceptibility of *A. hydrophila* and *A. salmonicida* was observed in the inhibition zone sizes of *A. hydrophila* and *A. salmonicida* strains when they were subjected to AWME3 for 12 h and 24 h with concentrations ranging between 1.88 and 40 mg/mL (Figure 15). Notably, *A. salmonicida* was more susceptible to AWM3 than *A. hydrophila*, while demonstrating more significant ($** p < 0.001$, $**** p < 0.0001$) than positive control IZD values at 15–40 mg/mL of concentrations on both 12 h and 24 h. AWME3 from BSFL fat proved its ability to inhibit the fish pathogenic bacteria *A. salmonicida* in a dose-dependent manner.

4.5. Antibacterial susceptibility testing of *Aeromonas* spp. to SEs by MIC and MBC assays

No epidemiological cut-off values for *Aeromonas* are currently available at EUCAST to interpret MIC. While MIC is the lowest concentration of an antibacterial agent necessary to inhibit visible growth, MBC is the minimum concentration of an antibacterial agent that results in bacterial death defined by

the inability to re-culture bacteria. The closer the MIC is to the MBC, the more bactericidal the compound [284].

Antibacterial activity of AWME1, AWME2, AWME3, and a mixture of all three SEs displayed a broad spectrum of antimicrobial activities was determined by broth microdilution assay method to assess the (MICs) and minimal bactericidal concentration (MBCs) values against two Gram-negative fish pathogens as shown in Table 8. The results demonstrated the highest bactericidal potency (both in MICs and MBCs) of the AWME3 against both tested Gram-negative *Aeromonas* pathogens, gradually decreasing from the second (AWME2) to the first (AWME1) sequential extracts. The mixture of AWME1, AWME2, and AWME3 (Mix) found to be less potent than AWME3 alone, albeit more potent than either AWME1 or AWME2 alone. Both AWME3 and Mix were more bactericidal against *A. salmonicida* than against *A. hydrophila*, as indicated by their equal MIC and MBC values. Surprisingly, *A. salmonicida* appeared less susceptible to both AWME3 and doxycycline compared to *A. hydrophila*, as demonstrated by higher MIC values. These results further supported our hypothesis that AWME3 is the most active extract among all three SEs and can inhibit the pathogenic fish bacteria at the lowest dose.

Table 8. MIC and MBC of SEs against fish pathogenic bacteria *Aeromonas* spp

Antibacterial extract	Parameter	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
AWME1	MIC	1500	1880
	MBC	1500	1880
AWME2	MIC	940	940
	MBC	1880	1880
AWME3	MIC	95	380
	MBC	190	380
Mix	MIC	730	940
	MBC	1460	940
Positive control (Doxycycline)	MIC	0.25	6.25
	MBC	0.5	12.5

Notes. MIC: Minimal inhibitory concentration; MBC: Minimal bactericidal concentration; Mix: Mixture of SEs in equal volumes of AWME1, AWM2, and AWME3 adjusted to the same concentration before treatment of *A. hydrophila* and *A. salmonicida* bacteria.

Based on our findings, AWME3 was selected to further evaluate this extract as potential for antimicrobial capacity against Gram-negative bacterial fish pathogens. For the first time, we demonstrated that AWME3 isolated from BSFL fat inhibited and killed bacteria at the lower dose MIC (0.095-0.38 mg/mL) and MBC (0.19-0.38 mg/mL), compared to the active compounds extracted from *Salix babylonica* that inhibited the growth of *A. hydrophila* at MIC, MBC (25, 100 mg/mL), respectively [285]. AWME3 was also more efficient than the methanolic extract from seeds and flowers of *Michelia champaca* that inhibited *A. hydrophila* growth at 31.3 and 15.6 mg/mL, respectively [286]. Our AWME3 extract was more active and potent than marine extracts of *Diadema setosum* (sea urchin) that contain polyunsaturated fatty acids, and recorded IZD 18.33 ± 0.58 mm at a concentration 50 mg/mL, while the MIC and MBC were 6.25 and 12.5 mg/mL, respectively against *A. hydrophila* [287]. The MIC for cinnamaldehyde was in the range 128-512 $\mu\text{g/mL}$, meanwhile MBC values ranged between 256 to 1024 $\mu\text{g/mL}$ against different isolates of *A. hydrophila* [288]. Emodin could eradicate the *A. hydrophila* at 2.5 mg/mL [289], while oleic acid inhibits both Gram-negative and -positive bacteria at a concentration of 0.5 mg/mL after 15 min treatment [95]. Notwithstanding, antibacterial substances from the metabolites of *Vitis rotundifolia* (Muscadine) roots [290] demonstrated MIC between 10 and more than 100 $\mu\text{g/mL}$ against pathogenic fish bacteria, albeit they exhibited bacteriostatic properties. In the present study, AWME3 was the most effective as an antibacterial substance from BSFL fat and could eradicate and inhibit the pathogenic fish bacteria at a low dose. The high AWME3 activity could embark an alternative for antibiotics in aquaculture habitats; consequently, it has a potential to eradicate and treat the MDR fish bacteria.

4.6. The MIC50 and growth curves of AWME3 against *Aeromonas* spp

The mean values of the half of the minimal inhibition concentration (MIC50) as well as the range of values obtained are important parameters for reporting results of susceptibility testing when several isolates of a given species are tested. The MIC50 represents the MIC value at which $\geq 50\%$ of the isolates in a test population are inhibited; it is equivalent to the median MIC value. The AWME3 concentration was adjusted into the correct concentration by mixing antimicrobial stock with media. The antimicrobial is serially diluted into multiple wells to obtain a gradient. The microbes came from the same colony-forming unit at the correct concentration adjusted to 5×10^5 CFU/mL and the MIC50 were determined

at 6 h, 12 h, and 24 h by measuring the turbidity (OD₆₀₀) of tested strains [280] and are presented in Figure 16 and Table 9.

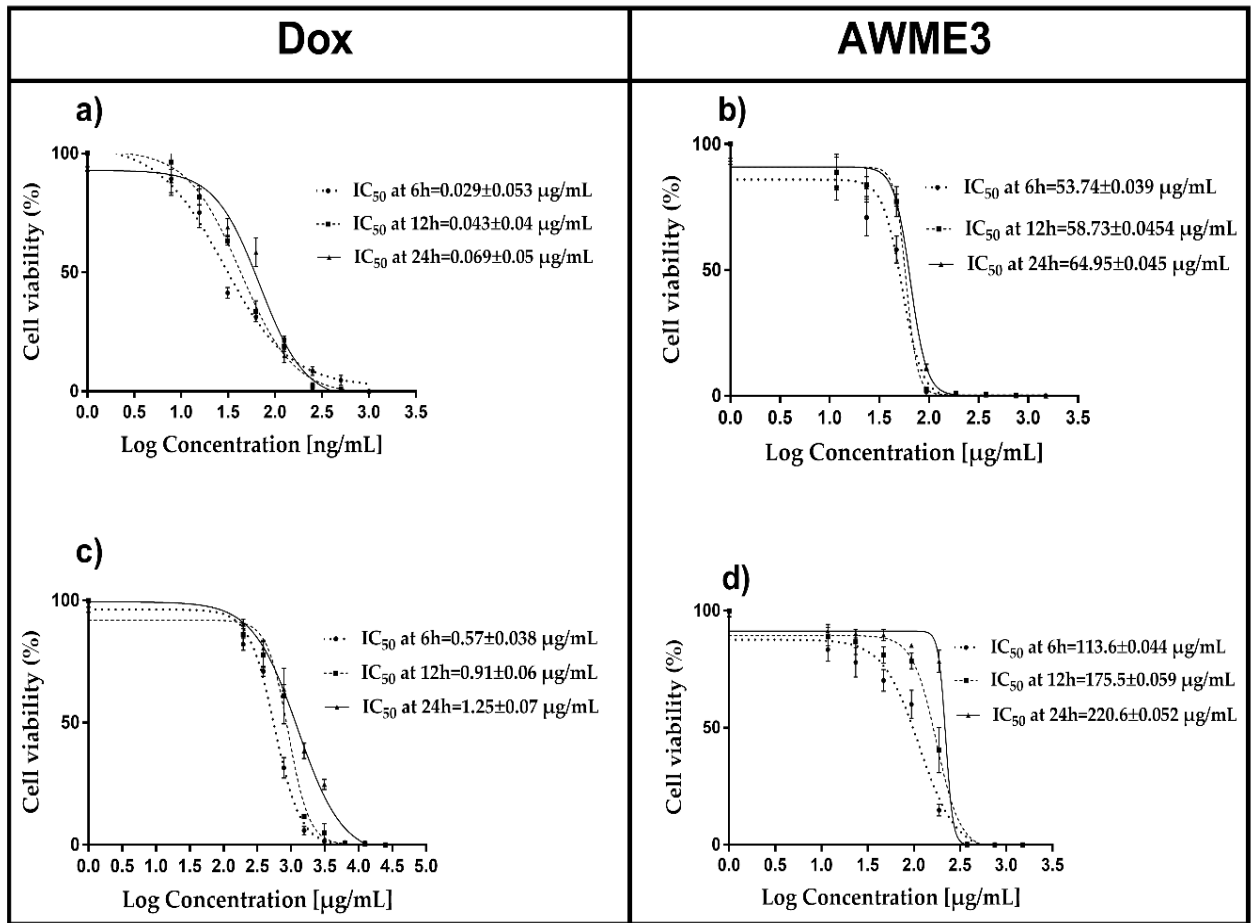


Figure 16. The MIC₅₀ of fish pathogenic bacteria treated with AWME3 from the larvae fat in comparison with the doxycycline (control antibiotic). The MIC₅₀ was determined based on the turbidimetric assay data and compared to the positive control doxycycline (Dox). The pathogenic cells turbidity assessed at 6 h, 12 h, and 24 h of incubation. *A. hydrophila* treated with (a) doxycycline (Dox) and (b) AWME3; *A. salmonicida* treated with (c) doxycycline (Dox) and (d) AWME3. MIC₅₀ values calculated by using a non-linear regression mode of Graph pad Prism7 software. Presented values are the mean \pm standard error of the mean. The IC₅₀ (MIC₅₀) values as an average of three independent experiments \pm standard deviation error mean (SEM).

Table 9. The antimicrobial efficacy of AWME3 and doxycycline (Dox) against *Aeromonas* spp. at different times of incubation

Bacteria Species	Dox ($\mu\text{g/mL}$)			AWME3 ($\mu\text{g/mL}$)		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
<i>A. hydrophila</i>	0.029 ± 0.05	0.043 ± 0.04	0.069 ± 0.05	53.74 ± 0.039	58.73 ± 0.045	64.95 ± 0.045
<i>A. salmonicida</i>	0.57 ± 0.038	0.91 ± 0.06	1.25 ± 0.07	113.6 ± 0.044	175.5 ± 0.059	220.6 ± 0.052

Comparison of MIC50 values indicated that *A. salmonicida* strain demonstrated higher resistance Dox than *A. hydrophila* strain at all-time intervals tested (more than 18-fold increase of MIC50). In contrast, both strains were less different (only a 2–3-fold difference of MIC50 values) in susceptibility to AWME3 at any time point. Comparing our results to those of Kot *et al.* [291,292], AWME3 found to be the most potent against *Aeromonas* spp.

The effect of AWME3 and doxycycline (the recommended antibiotic positive control) on the number of live cells in a bacterial population over 24 h period of *A. hydrophila* and *A. salmonicida* division measured by turbidimetric assay is illustrated in Figure 17. The treatment with AWME3 at the concentrations ≤ 24 $\mu\text{g/mL}$ extended the lag phase of *A. hydrophila* growth to 4 h, whereas in the presence of Dox at the concentrations ≤ 0.125 $\mu\text{g/mL}$ was only two hours. The lag phase of *A. salmonicida* under treatment with both AWME3 at the concentrations ≤ 190 $\mu\text{g/mL}$ and Dox at concentrations ≤ 0.78 $\mu\text{g/mL}$ were two hours. There was no exponential (or log) phase of *A. hydrophila* division under treatment with both AWME3 at the concentrations ≥ 190 $\mu\text{g/mL}$ and Dox at concentrations ≥ 0.250 $\mu\text{g/mL}$, whereas *A. salmonicida* did not grow under both AWME3 and Dox treatments at the concentrations ≥ 380 $\mu\text{g/mL}$ and ≥ 6.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Notably, the AWME3 treatment at the concentration 95 $\mu\text{g/mL}$ delayed the *A. hydrophila* division up to 12 h, while the slow division of *A. salmonicida* began only at 8 h. In contrast, the Dox treatment at any concentrations ≤ 0.125 $\mu\text{g/mL}$ did not delay the time of *A. hydrophila* log phase appearance, while delaying the shallow logarithmic growth of *A. salmonicida* up to 10 h at concentrations within the range 1.56–3.12 $\mu\text{g/mL}$ only. Under AWME3 treatment ≤ 12 $\mu\text{g/mL}$, the stationary phase of *A. hydrophila* growth began to appear starting from 20 h with further shallow progression, while AWME3 at the concentrations ≤ 95 $\mu\text{g/mL}$ induced less expression of the stationary phase of *A. salmonicida* division and the delay of the phase appearance up to 18 h at the concentration 190 $\mu\text{g/mL}$. Dox induced the stationary phase of *A. hydrophila*, which started from 8 h at the concentration 0.125 $\mu\text{g/mL}$ and then gradually decreased from 18 h down to 8 h within the decrement of the concentrations from 0.063 $\mu\text{g/mL}$ to 0.008 $\mu\text{g/mL}$. The same antibiotic persuaded the appearance of stationary-like *A. salmonicida* division starting from twenty hours at concentrations 1.56–3.12 $\mu\text{g/mL}$ and less obvious stationary-like division from 12 h with further shallow progression at the concentration range 0.19–0.78 $\mu\text{g/mL}$.

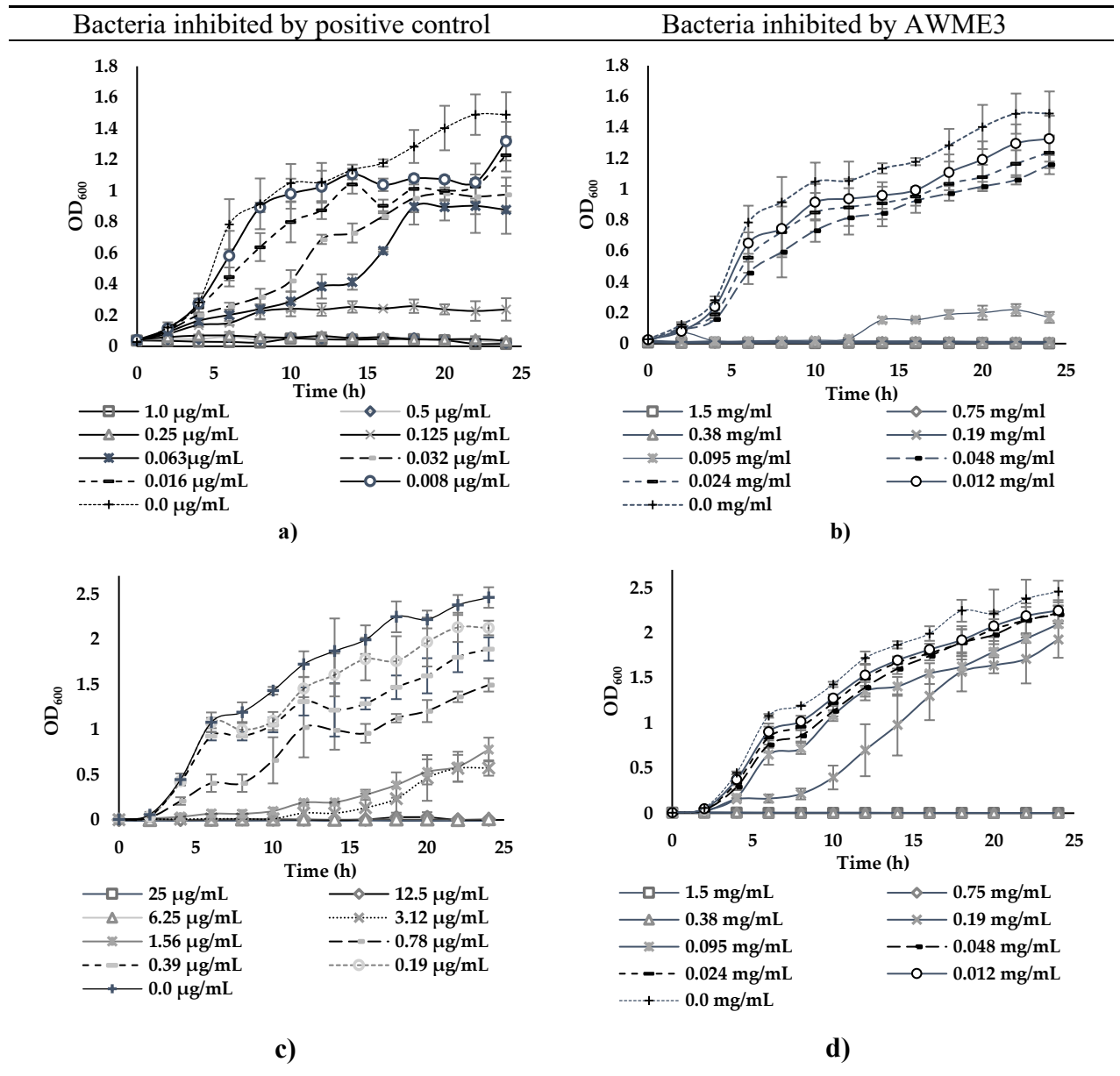


Figure 17 The growth curves of (a, b) *A. hydrophila* and (c, d) *A. salmonicida* treated with different concentrations of either AWME3, or Dox. Each data point is the average of three independent assays \pm Standard deviation of the mean (SD).

These results demonstrate that the AWME3 from BSFL fat can prevent and sustainably inhibit the proliferation and growth of the fish pathogens, including antibiotic-resistant *A. salmonicida* strain, as early as 6 h of incubation, thus potentially to be used as an antibacterial agent. Several studies stated that *Aeromonas* spp., growth curves inhibited by lipid derivatives and other natural active compounds [293–295]

4.7. GC-MS analysis of the sequential extracts from BSFL fat

The three sequential extracts AWME1, AWME2, and AWME3 were analysed using GC-MS instrument, where aliquot 50 µl at concentration 10 mg/mL of each extract was analysed separately. The GC-MS analysis identified 28–33 organic compounds in the AWMEs of larvae fat as indicated in Tables 10, Table S1, Table S2, and Table S3. The chemical profile of these compounds was determined based on the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA) database. After comparing the mass spectrum of the unknown AWME components with the range of the known chemicals from NIST library, the similarity of GC-MS spectrums more than 70% considered as the main criteria for that selection.

Table 10. Major compounds of various SEs of BSFL fat detected by GC-MS

	Common name	Chemical structure	C:D	AWME1		AWME2		AWME3	
				Peak Area %	SI %	Peak Area %	SI %	Peak Area %	SI %
SFAs	Palmitic acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	16:0	26.19	96	22.01	96	21.76	96
	Lauric acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	12:0	19.32	97	16.68	97	17.66	97
	Myristic acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	14:0	6.62	97	5.56	97	5.27	97
	Stearic acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	18:0	5.93	93	5.74	94	5.82	94
	Arachidic acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	20:0	0.34	88	0.46	91	0.31	90
	Capric acid	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	10:0	0.31	89	0.26	86	0.3	84
	Pentadecyclic acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ COOH	15:0	0.3	86	0.2	94	0.2	91
	Tridecyclic acid	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ COOH	13:0	0.19	83	0.18	87	ND	ND
USFAs	cis-oleic acid	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH (CH ₂) ₇ COOH	18:1	22.65	95	23.9	95	26.28	95
	Palmitoleic acid	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH (CH ₂) ₇ COOH	16:1	3.03	96	3.05	96	3.15	96

	Linoleic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}$ $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$ COOH	18:2	0.37	91	0.21	89	0.21	91
	9 - Octadecadienoic acid (Z)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	17:1	ND	ND	0.26	88	ND	ND
	Glycerol)	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	-	ND	ND	3.47	95	7.87	96
	9,12- Hexadecadienoic acid, methyl ester	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}$ $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$ COO-CH_3	-	ND	ND	ND	ND	0.25	78
FAs derivatives	Cis-9- Hexadecenal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}$ $(\text{CH}_2)_7\text{CHO}$	-	ND	ND	ND	ND	0.13	83
	2,4-Dodecadienal, (E,E)-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}$ $\text{CH}=\text{CH CHO}$	-	ND	ND	ND	ND	0.13	80
	Lauric acid beta- monoglycerol	$\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_4$	-	ND	ND	ND	ND	1.08	82
	Oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-	$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_3$	-	ND	ND	ND	ND	1.14	85

Notes. SFAs: saturated fatty acids; USFAs: unsaturated fatty acids; ND: not detected; SI%: Similarity percentage for detected compounds based on NIST-8 library; C: D, where C is the number of carbon atoms and D is the number of double bonds in the carbon chain

The GC–MS chromatogram of three sequential extracts (SEs) of BSFL fat showed a slight difference in its composition (Figures 18, Figure S4, Figure S5, and Figure S6).

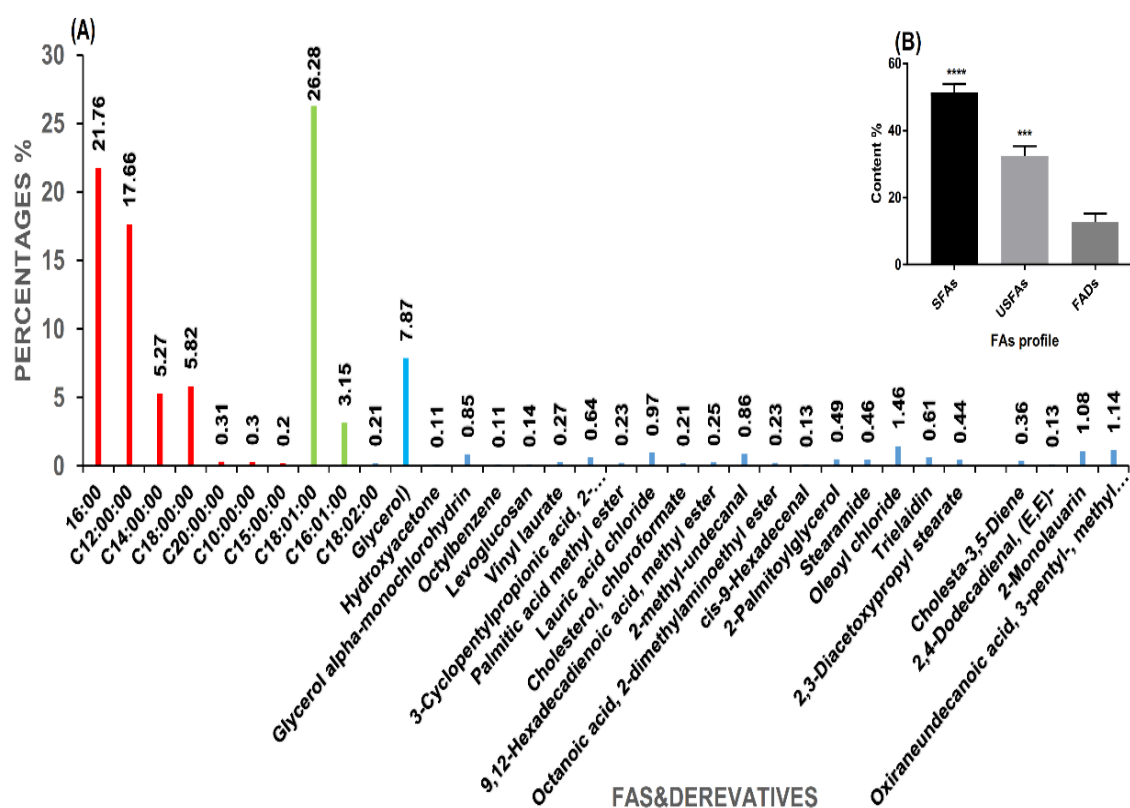


Figure 18. The composition of AWME3 extracted from *H. illucens* larvae fat under optimal conditions. **(A)** The percentages and the identity of the AWME3 chemical compounds detected by GC-MS analysis using the NIST-08 library; **(B)** The FAs profile that includes SFAs, USFAs, and FAs derivatives (FADs) statistically analysed (**** $p < 0.0001$) by one-way ANOVA.

GC-MS data revealed that the first extract AWME1 contained 28 peaks, while the second AWME2 and third AWME3 contained 31 and 33 peaks, respectively. The peaks were identified by comparing the mass spectra with NIST-8 library database (Figures S4-S6).

The chemical structure, retention time, molecular formula, molecular weight, and concentration (peak area %) are presented in Figures S4-S6, respectively. The GC-MS analysis showed the significant constituents of free fatty acids (FFAs) and their derivatives into each SEs of *H. illucens* larvae fat. Among FFAs, the content of saturated fatty acids (SFAs) dominates two folds by the concentration, compared to the unsaturated fatty acids (USFA). The content of SFAs in AWME1, AWME2, and AWME3 59.2%, 51.09%, and 51.32%, while the USFAs was 26.05%, 27.42%, and 29.64%, respectively (Table 10). The major FFAs were n-hexadecanoic acid (palmitic acid), octadec-9-anoic acid (oleic acid), dodecanoic acid (lauric acid), tetradecanoic acid (myristic acid), and octadecanoic acid (stearic acid). The AWME3 as the most potent antibacterial agent in inhibiting the pathogenic fish bacteria was

enriched in cis-oleic acid (C18:1, 26.28%) and glycerol (C3:0, 7.87%) compared to other SEs. AWME3 comprises several compounds with one or more cis-double bonds such as cis-oleic acid; 9,12-hexadecadienoic acid methyl ester; cis-9-hexadecenal; 2,4-dodecadienal, (E, E); lauric acid beta-monoglyceride; oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl- methyl ester, cis- were not found in AWME1 and AWME2 (Table 10). GC-MS result showed that AWME3 possessed the highest amount of USFAs, compounds with cis-double bonds, and glycerol suggested being the most potent antibacterial among the other SEs constituents extracted from the BSFL fat.

The composition of lipids varies depending on the method of larvae processing that can yield various fatty acids (FAs) profiles [31,37]. In an attempt to improve the extraction method of larvae processing, in the present study, we implemented three consecutive extractions, obtaining AWME1, AWME2 and AWME3 extracts from BSFL fat. The residual oil of the larval fat biomass after each extraction was subjected to subsequent extraction under the same condition as the primary extract. This procedure possibly enhanced the hydrolysis and crystallization, which led to liberating a significant amount of USFAs observed in the AWME3.

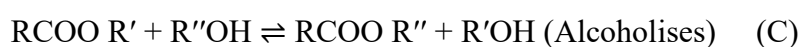
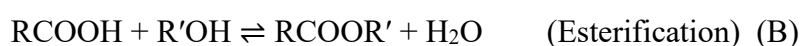
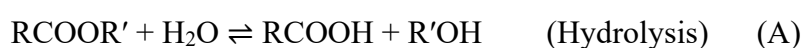
Sequential extraction (SE) is mainly based on the polarity and acidity used to remove the polar nonphenolic compounds such as sugars and organic acids. In the present study, the SE used the same extraction reagent, and there was a significant change in the content and the composition of FAs detected in the SEs. Also, the sequential extraction introducing products with higher purity and -greater activity [296]. Mai *et al.* (2019) [297] determined the content of FAs in crude and refined larvae oil obtained from BSFL, noticing a significant change occurred in the content of FAs, where the percentages of FAs such as palmitoleic (16:1), oleic (18:1) increased more in refined than crude oil that was matching with our study.

The prominent fatty acids profile of *H. illucens* larvae fat SEs are presented in Table 10. In our new consecutive extraction, the most abundant USFAs was cis-oleic acid (C18:1 n-9), representing 22.65-26.28% of the total fatty acids, followed by 3.03-3.15% of palmitoleic acid (16:1), These results are in line with 18.24 % and 2.36%, respectively, obtained by Rabani *et al.* (2019) [298], who used a hard-to-reproduce extraction method based on a proprietary biological decomposer and 5% acetic acid (to adjust pH to 6) to separate HI larvae lipids without pressing or warming. In contrast, our extraction procedure significantly enriched SFA, the leading group of fatty acids in all SEs (Table 10), including the most abundant (21.76-26.19%) palmitic (C16:0), and 5.82-5.93% stearic (C18:0) acid vs. 16.27% and 1.43% [298], respectively. Although our procedure allowed less isolation of lauric acid (C12:0) - 17.66-19.32% vs. 40.79%. Our results also corroborated earlier findings obtained [18,32,33,258]. Ewald *et al.* [257] reported higher percentages (3–13%) of linoleic acid (C18:2) compared to <1% found in our SEs content. Even though AWME1 contains the highest percentages of SFAs, its antibacterial activity was the lowest among other extracts against the fish pathogenic bacteria strains.

During our SE, new potentially bioactive molecules were liberated and detected in AWME3: 9,12-hexadecadienoic acid, methyl ester-0.25%; cis-9-hexadecenal-0.13%; 2,4-dodecadienal, (E, E)-0.13%; lauric acid beta-monoglyceride-1.08% and cis-oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester -1,14% (Figure 18). Albeit the yield of extract decreased gradually from 60 to 30 mg in AWME3, the amount of USFAs, particularly cis-oleic acid (18:1), increased from 22.65% in the first to 26.28% in the third SE (Table 10). These findings were in line with Imbimbo *et al.* [299], who extracted 2.5% and 34% of polyunsaturated fatty acids (PUSFAs) from the raw biomass of *Galdieria phlegrea* and the residual biomass, respectively. Of note, the glycerol percentages increased gradually from 0% (AWME1) to 7.87% (AWME3), while Ushakova *et al.* (2016) [45] detected traces (0.36%) of glycerol in *H. illucens* larvae oil.

It might be helpful to understand the chemical reactions that occur through the SE processes of the *H. illucens* larvae fat. The physical and chemical properties of lipids depend on the composition of their fatty acids, the length and saturation degree of the carbonic chain, and their melting points. Thermal hydrolysis takes place mainly within the oil phase rather than on the water-oil interface. Hydrolysis is more desirable in oil with short USFAs, such as cis-9-hexadecenoic acid, octadec-9-enoic acid (cis-oleic), than oil with long SFAs, like stearic, myristic, and lauric acid, because short USFAs are more soluble in water than long saturated fatty acids. The long-time contact between the oil and the aqueous phase of the larval fat increases hydrolysis of BSFL oil. Besides, a large amount of water (90%) in our extraction reagent might rapidly increase larval oil's hydrolysis [300,301].

There are three equations (A, B, C) controlled and represent the flow of chemical reactions which occur continuously during the conventional extraction method [67].



Following our SE processing, FFAs were liberated from BSFL fat during several steps, including hydrolysis, sonication, and homogenization under the condition of slow hydrochloric acid catalysis. Furthermore, the acid catalysis in water promoted the hydrolysis reaction in the sequential extraction. Besides, several treatments during the sequential extraction of the larval fat led to limited modifications observed in the composition of the third extract compared with the other SEs. USFAs presented in the various SEs were octadec-9-enoic acid (cis-oleic acid), 9, 12-octadecadienoic acid (Z, Z) - (linoleic acid), and cis-9-hexadecenoic acid (palmitoleic acid) (Table 10).

To release USFAs from the solid fat, we used methanol for esterification of larval fat to be dissolved in the aqueous phase at 52 °C followed by a complete extraction for 24 h at room temperature (20 °C). The temperature decrease led to the crystallization of the SFAs during the first round of extraction to produce various levels of FAs. A proportion of SFAs were also homogenized and interfaced with the aqueous phase based on their melting points through hydrolysis. The crystallization process was visible after storage of these concentrated SEs in the refrigerator at 4 °C, where SFAs were crystallized on the surface while the USFAs were soluble in the extraction solution [67]. These USFAs possessed antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria [271,279,302]. Furthermore, they were effective against multidrug-resistant bacteria [55], where 9, 12-hexadecadienoic acid, methyl ester, cis-9-hexadecenal, 2, 4-dodecadienal, (E, E)-, dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester (lauric, acid beta. -monoglyceride), oxiraneundecanoic acid, and cis- 3-pentyl-, methyl ester, the new compounds GC-MS detected in AWME3, are known to possess antimicrobial activity against different pathogenic bacteria strains [110,303].

Our data suggested that fatty acids, the main constituents of oils and fats, might be partially esterified to glycerol during the sequential extraction. Indeed, AWME3 was enriched in glycerol by 7.87%, compared to AWME1 by 0% and AWME2 by 3.47% (Table 10). The high amount of glycerol possibly resulted from the high hydrolysis rate of the remaining oil, where the hydrolysis rate increased. The esterification by methanol using HCl as catalyst allows more access for methanol and the acid to hydrolyse the residual oil to produce glycerol as a by-product along with FFAs. In addition, the residual biomass of the larval fat was in the liquid state, promoting hydrolysis in the second and the third round of extraction [304]. Glycerol evaporates at 150 °C, while SEs are concentrated under a vacuum at 45 °C. Hydrolysis was carried out three rounds during the SE for the same biomass, which led to the accumulation of glycerol in the oil phase and promotion of the monounsaturated FFAs production by hydrolysis reported previously [305]. Di- and monoacylglycerols, glycerol, and FFAs presented in the oil phase accelerate the further hydrolysis reaction of oil [306]. The positional and geometric isomers predominately presented in FAs in the cis-isomers form, in natural lipids promote the crucial role of FAs in killing microbes. Oxygenated functional groups of naturally occurring fatty acids include the hydroxyl, keto, and epoxy groups. The hydroxy-substituted acids are most commonly abundant in FAs. Oleic acid is the most widespread and is an article of commerce and a component of all dietary fat while antibacterial effective against pathogenic bacteria [10]. Noteworthy, our improved extraction procedure enabled significant enrichment of this valuable component in AWME3 (Table 10) compared to other published methods of HI larvae fat extractions.

Livestock activities of fish farming are affected by infectious diseases, mainly associated with bacteria *Aeromonas* spp, which have been linked with mortality ranged between 50% and 100% in aquaculture production systems. Therefore, the antibacterial properties of obtained SEs were determined by several assays against pathogenic fish bacteria. Our data demonstrated that the activity of the SEs from the BSFL fat increased dramatically due to these consecutive extractions. AWME3 turned out to be the most active among the different SEs obtained by exploring the same biomass of BSFL fat. Furthermore, *A. hydrophila* and *A. salmonicida* were inhibited and killed at a low dose of AWME3. The activity of the three-mixed SEs was less than AWME3 alone. We suspect that AWME3 possessed the highest antibacterial activity against tested strains because of the high amount of oleic acid (26.28%), but not due to glycerol (7.87%), albeit the antimicrobial activity of the last one was reported [272]. We tested the same proportion of pure glycerol (7.87%) by mixing with the AWME1 under the aseptic condition to give the final concentrations 40 mg/mL of the glycerol-AWME1 mixture. The resulted IZD value of glycerol-AWME1 mixture was not significantly different from AWME1 alone against pathogenic fish bacteria, where the efficacy of glycerol appeared after 48h or 72h. This result corroborates the study of Saegeman *et al.* [307] that reported only higher concentrations of glycerol (85%) and higher temperatures of incubation had a long-term antimicrobial effect and virucidal activity on several types of viruses. Furthermore, several studies discussed the effect of glycerol on bacterial growth inhibition as bacteriostatic or enhances growth and antimicrobial properties of selected *Vibrio* bacteria [308,309]. On the other hand, glycerol molecules react with fatty acids like lauric acid and form glycerol monolaurate (G ML). In our study, AWME3 contains 32.12% compounds with one or more cis-double bonds, which proved to increase the antibacterial activity of fatty acids and their derivatives, as reported by Yoon *et al.* [95].

Chapter 5. Effect of *H. illucens* larvae fat AWME3 extract on XDR and MDR human pathogenic bacteria and eukaryotic HEK-293 cells

5.1. MDR assessment of human *Klebsiella pneumoniae* strains

The antibiotic resistance phenomenon represents one of the most critical public health issues, and antibiotic resistance genes are considered the emerging pollutant of the environment [310]. The disk diffusion method was used to determine the antimicrobial AWME3 susceptibility effect on the three bacterial strains: *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, *K. pneumoniae* KPM9, and *K. pneumoniae* KP1627. IZD values were interpreted in comparison to *Escherichia coli* values because there are no guidelines breakpoints for *K. pneumoniae* in CLSI guidelines. The breakpoints of *E. coli* are recommended and used for other *Enterobacteriaceae* such *Klebsiella* species [311]. To evaluate the susceptibility of three tested strains of *K. pneumoniae* IZDs were measured using disk assay, and MIC, MBC values were determined by microdilution method (Tables 11-12, Figure S7), which is recommended by CLSI, 2018 [235]. *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 showed resistance to twelve, while *K. pneumoniae* KP1627 and *K. pneumoniae* KPM9 were resistant towards only six of fourteen tested antimicrobials.

Table 11. Antibiotic susceptibility of human *Klebsiella pneumoniae* strains

Antibiotics	IZD (mm)								
	KP ATCC BAA-2473		KPi 1627		KPM9		Breakpoint (mm)		
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	R	I	S
G	0 (R)	0 (R)	16.55±2.36 (S)	16.1±0.2 (S)	16.93±1.18 (S)	16.72±2 (S)	≤12	13-14	≥15
Ch	10.27±0.07 (R)	9.92±1 (R)	21.55±0.19 (S)	21.7±1.9 (S)	18.33±2.1 (S)	18.15±1.6 (S)	≤12	13-17	≥18
K	11.1±0.72 (R)	10.87±0.27 (R)	21.33±0.47 (S)	22.36±1.84 (S)	22.36±1.84 (S)	20.7±1.6 (S)	≤13	14-17	≥18
Dox	18.48±2.3 (S)	18.1±1.2 (S)	19.18±0.8 (S)	18.62±0.35 (S)	18.68±0.9 (S)	17.43±0.8 (S)	<10	11-13	≥14
P/S	0 (R)	0 (R)	14.7±0.42 (I)	14.45±0.44 (I)	15.56±0.37 (S)	14.88±0.23 (I)	≤11	12-14	≥15
CT	11.6±0.14 (S)	11.35±0.49 (S)	8.52±0.38 (R)	8.12±0.26 (R)	9.74±0.76 (R)	9.23±0.26 (R)	≤10	-	≥11
RD	0 (R)	0 (R)	9.38±0.47 (R)	9 ±0.79 (R)	10.36±0.86 (R)	10.5±0.75 (R)	≤16	17-19	≥20
E	9.5±1.13 (R)	10.1±1.5 (R)	9.97±0.71 (R)	9.9±0.75 (R)	10.57±0.53 (R)	10.35±0.41 (R)	≤13	14-22	≥23
VA	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	-	-	≥15
P	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	≤28	-	≥29
Amp	0 (R)	0 (R)	12.08±0.7 (R)	11.62±0.44 (R)	12.48±0.44 (R)	11.78±0.6 (R)	≤13	14-16	≥17
Cef	0 (R)	0 (R)	29.35±0.64 (S)	28.9±0.82 (S)	30.9±0.61 (S)	30.48±0.56 (S)	≤18	-	≥25
Cip	0 (R)	0 (R)	29.23±0.85 (S)	28.85±0.39 (S)	30.53±0.33 (S)	29.95±0.24 (S)	≤15	16-20	≥21
Lev	0 (R)	0 (R)	29.1±0.57 (S)	28.87±0.66 (S)	29.33±0.4 (S)	29±0.33 (S)	≤13	14-16	≥17

Abbreviations: G, gentamicin; Ch, chloramphenicol; K, kanamycin; Dox, doxycycline; P/S, penicillin-streptomycin; CT, colistin; RD, rifampicin; E, erythromycin; VA, vancomycin; P, penicillin; Amp, ampicillin; Lev, levofloxacin; Cip, ciprofloxacin; Cef, cefepime; R, resistant; I, intermediate; S, susceptible; (0), means no inhibition zone around the disc on the plate; (-), not determined.

Table 12. MICs, MBCs, and MBC/MIC ratio of different antibiotics against human pathogenic *K. pneumoniae* strains

Antibiotics	<i>K. pneumoniae</i> KPi1627			<i>K. pneumoniae</i> KPM9			<i>K. pneumoniae</i> ATCC-2473			MIC break point (µg/mL) recommended by CLSI		
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	S	I	R
G	2.25 (S)	2.25	1	1.56 (S)	3.12	2	≥1250 (R)	≥1250	-	≤4	8	≥16
Ch	6.25 (S)	25	4	6.25 (S)	50	8	39 (R)	156	4	≤8	16	≥32
K	12.5 (S)	25	2	12.5 (S)	12.5	1	≥1250 (R)	≥1250	-	≤16	32	64
Dox	1.56 (S)	6.25	4	3.12 (S)	12.5	4	6.25 (I)	50	8	≤4	8	≥16
P/S	9.77 (S)	9.77	1	9.77 (S)	9.77	1	≥1250 (R)	≥1250	-	-	-	-
CT	≥1250 (R)	≥1250	-	11.33 (R)	11.33	1	0.39 (S)	1.56	4	≤2	-	≥4
RD	78 (R)	312.5	4	39 (R)	78	2	≥1250 (R)	≥1250	-	≤1	2	≥4
E	625 (R)	625	1	625 (R)	1250	2	625 (R)	≥1250	-	≤0.5	1-4	≥8
P	312.5 (R)	312.5	1	625 (R)	625	1	≥1250	≥1250 (R)	-	≤0.12	-	≥0.25
Amp	156.25 (R)	625	4	156.25 (R)	312.5	2	≥1250 (R)	≥1250	-	≤8	16	≥32
Lev	0.39 (S)	0.39	1	0.098 (S)	0.195	2	156 (R)	625	4	≤2	4	≥8
Cip	0.39 (S)	0.39	1	0.39 (S)	0.39	1	156 (R)	312.5	2	≤1	2	≥4
Cef	1.56 (S)	6.25	4	0.08 (S)	0.08	1	25 (R)	100	4	≤2	-	≥16

Values obtained were compared with those recommended by the CLSI.

Abbreviations: G, gentamicin; Ch, chloramphenicol; K, kanamycin; Dox, doxycycline; P/S, penicillin-streptomycin; CT, colistin; RD, rifampicin; E, erythromycin; VA, vancomycin; P, penicillin; Amp, ampicillin; Lev, levofloxacin; Cip, ciprofloxacin; Cef, cefepime; R, resistant; I, intermediate; S, susceptible; (0), means no inhibition zone around the disc on the plate; (-), not determined.

All *K. pneumoniae* strains demonstrated sustainable 100% resistance to penicillin, vancomycin, erythromycin, and rifampicin strains during 12 h and 24 h of incubation. All tested *K. pneumoniae* strains isolated from different sources exhibited high susceptibility to doxycycline (Figure S7, Table 11), being the rationale of using it as a positive control in the current

study. *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 was 100% resistant to gentamicin and penicillin, where no IZD occurred around the discs at 12 h and 24 h of the incubation and possessed high resistance towards kanamycin and chloramphenicol confirmed by the IZD in the disk diffusion assay (Figure S7). Moreover, MIC determined *via* microdilution assay shows that *K. pneumoniae* KPi1627 and *K. pneumoniae* KPM9 were resistant to six antimicrobial drugs belong to five classes, while *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 exhibited the highest resistance compared to other two strains, where it was resistant to all tested antibiotics except two categories (colistin, doxycycline) (Table 11). Of note, both wild-type nosocomial KPi 1627 and environmentally isolated KPM9 strains were resistant to colistin, the antibiotic of last resort that is broadly active against Gram-negative bacteria despite having side effects, including nephrotoxicity and ototoxicity. In contrast, *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain was susceptible to this antibiotic, but show high resistance to fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin), and cepheims (cefepime) groups. On the other hand, *K. pneumoniae* KPi1627 and *K. pneumoniae* KPM9 showed a significant susceptibility to the same categories of antibiotics (Cip, Levo, Cef) (Table 11). Based on the ratio of MBC/ MIC, all antibiotics categories were classified as bactericidal or bacteriostatic. Thus, if the ratio $MBC/MIC \geq 4$, bacteria was to be bacteriostatic, while $MBC/MIC \leq 2$, bacteria was bactericidal. In our study chloramphenicol, doxycycline, rifampicin, ampicillin, and cefepime showed bacteriostatic activity against *K. pneumoniae* KPi1627.

The antibacterial agents chloramphenicol and doxycycline displayed bacteriostatic properties against *K. pneumoniae* KPM9 strain, while five important antibiotics, including chloramphenicol, doxycycline, colistin, levofloxacin, and cefepime were bacteriostatic against *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 (Table 12). Based on our findings, colistin and doxycycline we would recommend treating *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, while gentamycin, kanamycin, penicillin-streptomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, and cefepime we would recommend treating both, *K. pneumoniae* KPi1627 and *K. pneumoniae* KPM9 strains. The percentage of antibiotic resistance of *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, *K. pneumoniae* KPi1627 and *K. pneumoniae* KPM9 towards the fourteen different antibiotics were 83.33, 42.86, and 42.86 %, respectively. Hence, *K. pneumoniae* KPi1627 and *K. pneumoniae* KPM9 strains were classified as a multidrug-resistant (MDR) based on their resistance to two or more antibiotics, while *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 was classified as a extensive drug resistant (XDR), because it was resistant to all antibiotics except two categories (doxycycline, colistin) of a total of fourteen used in our study (Table 13) [236].

Table 13. Antimicrobial resistance pattern of human pathogenic *K. pneumoniae* strains ($n = 3$)

Antibiotic classes	Specific antibiotic	Interpretation					
		Sensitive		Intermediate		Resistance	
		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Aminoglycosides	Gentamycin	2	66.7	-	-	1	33.3
	Kanamycin	2	66.7	-	-	1	33.3
	Penicillin-streptomycin	2	66.7	-	-	1	33.3
Ansamycins	Rifampicin	-	-	-	-	3	100
Glycopeptides	Vancomycin	-	-	-	-	3	100
Macrolides	Erythromycin	-	-	-	-	3	100
Tetracyclines	Doxycycline	2	66.7	1	33.3	-	-
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	2	66.7	-	-	1	33.3
	Levofloxacin	2	66.7	-	-	1	33.3
Phenicols	Chloramphenicol	2	66.7	-	-	1	33.3
Penicillins	Penicillin	-	-	-	-	3	100
	Ampicillin	-	-	-	-	3	100
Lipopeptides	Colistin	1	33.3			2	66.7
Cephems	Cefepime	2	66.7	-	-	1	33.3
<i>P value</i>		$P < 0.0001$		$P < 0.0001$		$P < 0.0001$	

K. pneumoniae has experienced increased resistance to various antibiotics, particularly those strains with carbapenem enzymes that are highly virulent and acquire resistance to multiple antibiotics leading to a high mortality rate in immunocompromised patients [311]. *K. pneumoniae* strains KPM9 and KPi1627 have genes on both chromosomes and plasmid associated with virulence and antibacterial resistance identified in their genomes. Furthermore, these genes are responsible for the hypermucoviscosity of these strains. *K. pneumoniae* KPi1627 and *K. pneumoniae* KPM9 were reported to have K1 and K20 capsids responsible for virulence and pathogenicity [233]. MDR can be conferred in bacteria *via* genetic mutation and horizontal gene transfer through chromosomes, plasmids, transposons, and other mobile genetic elements [312]. In the current study, a high rate of quinolone (levofloxacin, ciprofloxacin) resistance was evident among *K. pneumoniae* (33.3%), where *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 had MICs equal 156 µg/mL, while the MBC values caused by levofloxacin, ciprofloxacin were 625 µg/mL and 312.5 µg/mL, respectively. The resistance to fluoroquinolone groups among *K. pneumoniae* strains is mostly caused by mutations targeting the quinolone resistance-determining regions (QRDR) of *gyrA*, and *parC* of *DNA*gyrase and topoisomerase [313]. Thus, there is an immediate need for novel treatment modalities targeting the MDR microbes [314]. As resistance rates continue to rise, novel approaches to antimicrobial therapy for MDR bacteria, including carbapenem-resistant enterobacteria, will become increasingly critical. Although doxycycline and colistin found to be the most potent among other 14 antibiotics, but they have significant clinical

drawbacks, such as toxic side effects caused by colistin and a poor distribution to specific important body sites, including blood and urine by tigecycline. Even novel agents, such as ceftazidime-avibactam, are vulnerable to the emergence of resistance [315]. Aminoglycosides like streptomycin and gentamycin are often used in combination with penicillin to treat severe nosocomial infections. Similar to aminoglycosides, amphenicols like chloramphenicol inhibit protein synthesis [316]. The resistance of *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 caused by several antibiotics during the second 12 h of incubation time in the present study was developed due to the expression of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) or New Delhi Metallo-beta-lactamase 1 (NDM) [317].

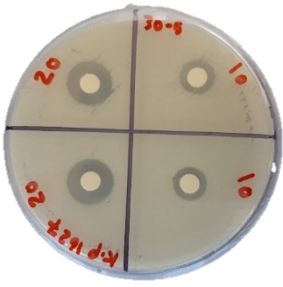


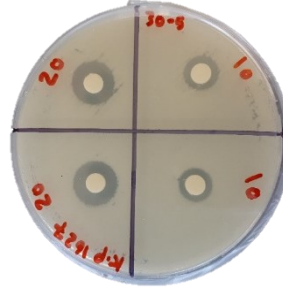
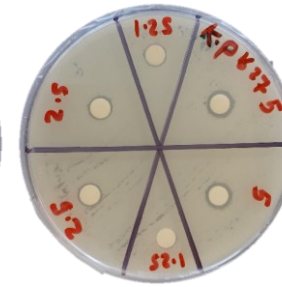

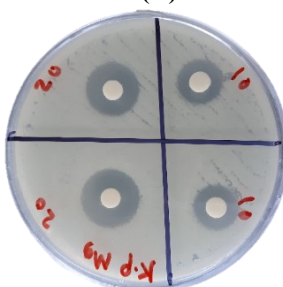
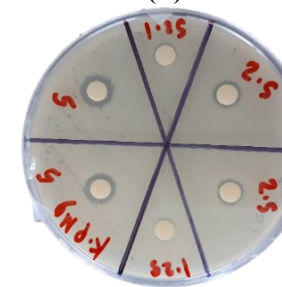
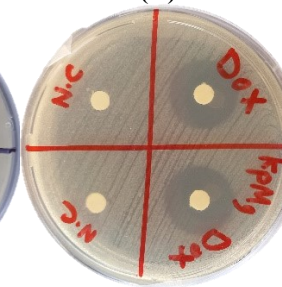
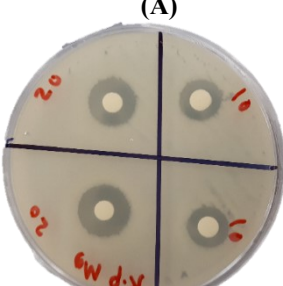
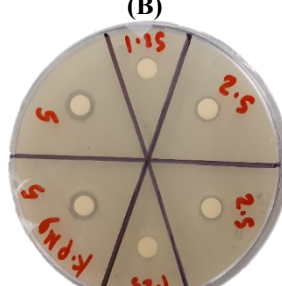
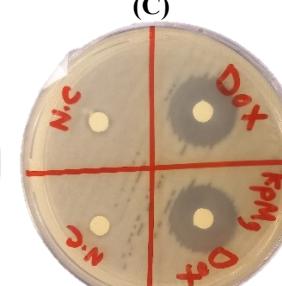
5.2. Antibacterial activity of AWME3 against *K. pneumoniae* strains

Different concentrations of AWME3 were tested against the *K. pneumoniae* strains using a disk diffusion assay to assess the antibacterial activity. All tested Gram-negative bacteria strains were treated with 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL concentrations of AWME3, which were loaded as 50 μ L aliquots on the 6 mm diameter discs. The IZD was determined by measuring the inhibition halos induced by AWME3 around the discs at 12 h and 24 h of incubation time (Table 14, Figure 19). For the first time, AWME3 extract activity was evaluated against clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* KPi1627 and *K. pneumoniae* KPM9 strains, respectively, compared with standard *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain.

Table 14. Inhibition zone diameters (IZD) caused by AWME3 of *H. illucens* larvae fat against *K. pneumoniae* strains

AWME3 (mg/mL)	IZD (mm)					
	KP ATCC BAA-2473		KPM9		KPi1627	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
20	22.8±0.47	19.72±0.51	18.7±0.52	16.52±0.74	14.83±0.49	14.23±0.35
10	14.7±0.26	13.88±0.35	13.6±0.56	12.98±0.39	11.6±0.34	10.5±0.37
5	12.73±0.21	10.78±0.33	10.25±0.4	9.48±0.28	9.43±0.24	8.67±0.24
2.5	11.17±0.24	9.25±0.54	8.1±0.33	7.67±0.25	7.45±0.32	7.18±0.19
1.25	8.9±0.45	8.06±0.52	7.15±0.27	6.63±0.2	6.86±0.19	6.5±0.23
P.C (Dox)	18.48±2.3	18.1±1.2	19.18±0.8	18.62±0.35	18.68±0.9	17.43±0.8
N.C	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Notes: ND: not determined; N. C: negative control, P.C (Dox): positive control (Doxycycline) at concentration 600 μ g/mL (30 μ g/disk).

Time	(a) <i>K. pneumoniae</i> KPi1627		
12 h	(A) 	(B) 	(C) 
24 h	(b) <i>K. pneumoniae</i> KPi1627		
	(A) 	(B) 	(C) 
12 h	(c) <i>K. pneumoniae</i> KPM9		
	(A) 	(B) 	(C) 
24 h	(d) <i>K. pneumoniae</i> KP M9		
	(A) 	(B) 	(C) 
12 h	(e) <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-2473		
	(A)	(B)	(C)

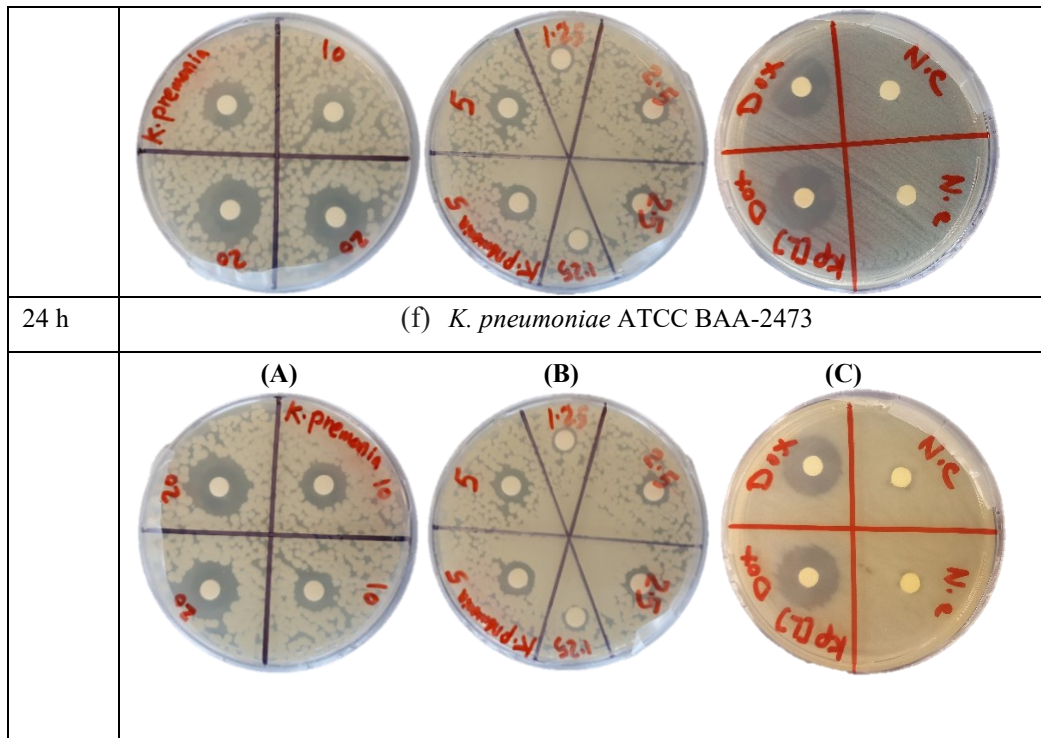


Figure 19. The inhibition zone assay for tested bacteria strains. The inhibition zone diameters were measured after 12 h and 24 h of overnight incubation of the discs loaded on Petri dishes agar seeded with (a, b) *K. pneumoniae* KPi1627; (c, d) *K. pneumoniae* KP M9; and (e, f) *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strains with suspension 5×10^8 CFU/mL; (A). The discs were loaded with 50 μ L of AWME3 from larvae fat with concentrations 10 and 20 mg/mL; (B) 50 μ L of AWME3 loaded with 1.25, 2.5 and 5 mg/mL; (C) 50 μ L of Dox with concentration 600 μ g/mL (30 μ g/disk) was used as positive control and 50 μ L of pure AWM extracting reagent was used as a negative control (N.C). All samples were loaded in duplicates.

The ANOVA results indicated a significant difference between the mean inhibition halos obtained by treating the different human pathogenic bacteria strains with the AWME3, when compared to the IZD caused by the reference antibiotic (Dox) ($p \leq 0.05$). The most significant inhibition zone size belongs to *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 and *K. pneumoniae* KPM9, indicating their highest susceptibility to the AWME3 obtained from the natural fat of *H. illucens* larvae. Their IZD values were 19.72 ± 0.51 mm, and 16.52 ± 0.74 mm, respectively, when treated with 20 mg/mL at 24 h of incubation, compared to the positive control (Dox) 18.1 ± 1.2 mm and 18.62 ± 0.35 mm, respectively. *K. pneumoniae* KPi1627 strain was the least susceptible and recorded a significant difference (**** $p < 0.0001$) compared to the reference control at 12 h and 24 h of incubation time (Figure 20). Our results show that all these MDR strains isolated from different sources can be inhibited in a dose-dependent manner by AWME3. Moreover, all tested *K. pneumoniae* strains were eradicated and killed at 20 mg/mL concentration of AWME3. Several studies on new antimicrobial agents have led to FAs being considered an alternative drug to combat MDR bacteria. The antibacterial properties of FAs have been known for a long time. Plants, algae, and animals produce FAs to defend against pathogens, including multidrug-

resistant bacteria [318,319]. Our previous studies demonstrated that FAs extracted sequentially from *H. illucens* larvae have significant antimicrobial activity against MDR *Aeromonas* spp., and phytopathogenic bacterial strains [31,72]. AWME3 extract isolated *via* sequential extraction from *H. illucens* larvae fat exhibited high activity compared to the oil of *H. illucens*, where IZD recorded 9.60 ± 2.75 mm against *S. aureus* determined by others, further methanolic extract of *H. illucens* larvae caused IZD in the range 7-9 mm against *K. pneumoniae* at 20 mg/mL [320].

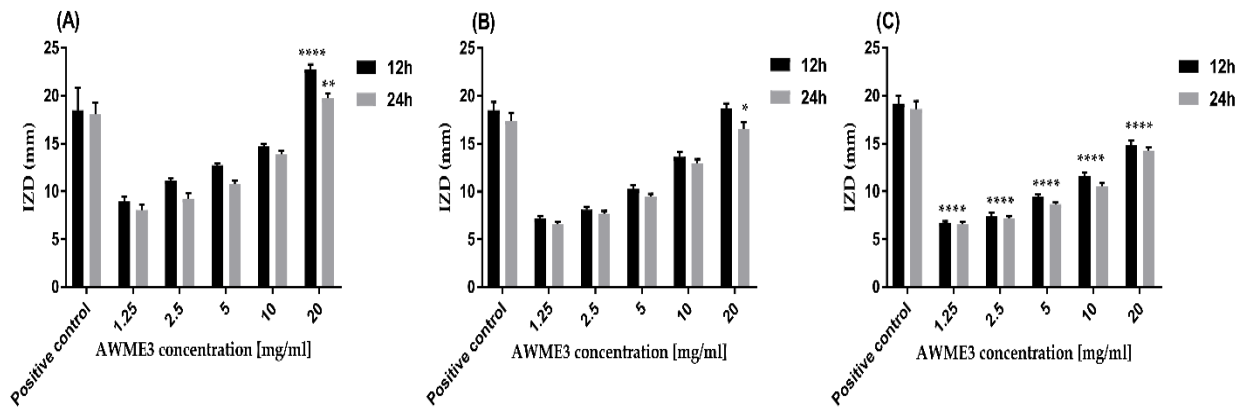


Figure 20. Antimicrobial sensitivity of AWME3 against (A) *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, (B) *K. pneumoniae* KPM9 and (C) *K. pneumoniae* KPi1627 strains. The bacteria strains were subjected to concentrations of 1.25, 2.5, 5, 10, and 20 mg/mL of AWME3 from BSFL fat. The IZD values were measured after 12 h and 24 h of incubation at 37 °C. Doxycycline (Dox) used as a positive antibacterial control. All values are represented as mean \pm SD, in triplicate (n = 3). Data were analysed by two-way ANOVA, followed by Dunnett's Test. Data represented as significant difference as compared to positive control and p-value was ranged between *p = 0.0138 and ****p < 0.0001.

Table 15 shows the MICs of the AWME3 for all tested bacteria strains obtained after 24 h of incubation. AWME3 inhibited *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, *K. pneumoniae* KPM9 and *K. pneumoniae* KPi1627 growth at MIC concentration 250 μ g/mL. The doxycycline (positive control) inhibited the growth of *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 bacteria at MIC 6.25 μ g/mL, while inhibition of *K. pneumoniae* KPM9 and *K. pneumoniae* KPi1627 growth was obtained at MICs 3.12 μ g/mL and 1.56 μ g/mL, respectively. All tested strains were treated with different concentrations of the positive control in the range 0.195-50 μ g/mL. MBC is defined as the lowest concentration, killing 99.99% of the tested bacteria strains after 48 h of incubation time. AWME3 demonstrated equal MBC 250 μ g/mL for all tested human *K. pneumoniae* pathogens. In contrast, MBC 50 μ g/mL for doxycycline was the highest for *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain, compared to MBC 12.5 μ g/mL for *K. pneumoniae* KPM9 and MBC 6.25 μ g/mL for *K. pneumoniae* KPi1627 isolates. The ratio of MBC/MIC did not exceed 2 for AWME3 while ranging between 4 and 8 for the positive control (Dox). These results demonstrated that

AWME3 has sustainable bactericidal activity comparable to the reference antibiotic control (Dox) that exhibited bacteriostatic activity against all tested *K. pneumoniae* strains. Furthermore, the MBC 250 µg/mL of AWME3 was lower than the MBC of nine antibiotics (gentamycin, penicillin-streptomycin, kanamycin, rifampicin, erythromycin, penicillin, ampicillin, levofloxacin, and ciprofloxacin) used to be tested against *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, where their MBC ranged between 312.5 µg/mL to ≥ 1250 µg/mL (Table 12).

Table 15. Antibacterial activity measured by MIC and MBC of AWME3 against *K. pneumoniae* strains

Antibacterial agent	Activity	Concentration (µg/mL)		
		KP ATCC BAA-2473	KPM9	KPi 1627
AWME3	MIC	250	250	250
	MBC	250	250	250
	MBC/MIC (ratio)	1.0	1.0	1.0
Positive control (DOX)	MIC	6.25	3.12	1.56
	MBC	50	12.5	6.25
	MBC/MIC (ratio)	8.0	4.0	4.0

Several studies on new antimicrobial agents have led to FAs being considered as an alternative drug to combat MDR bacteria. The antibacterial properties of FAs have been known for a long time. Plants, algae, and animals produce FAs to defend against pathogens, including multidrug-resistant bacteria [318,319]. Nevertheless, our results were commensurate with the findings of fatty acids methyl esters extracts of the blind eye mangrove and lipophilic extracts of various parts of the plant *Pistacia vera* [30,321]. Some microalgae such as *Chlorella vulgaris*, *Planktochlorella nurekis*, and *Ulva rigida* produces chlorelin, a mixture of FAs that inhibit clinical and non-clinical MDR bacteria [322–325]. El Shafay *et al.* [326] isolated and identified the antibacterial FAs from *Sargassum vulgare* and *Sargassum fusiforme* extracts, which kill the MDR clinical isolates *S. aureus* and *K. pneumoniae*. Hexane extract of *Halimeda discoidea*, which contains FAs such as palmitic acid, inhibits *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 [327], furthermore these results were in line with our results.

The oleic, linoleic, linolenic acids have the most potent antibacterial activity among long-chain unsaturated fatty acids (USFAs). In contrast, long-chain saturated fatty acids (SFAs), including palmitic and stearic acid, are less active [135]. *H. illucens* larvae fat contains a significant quantity of USFAs, especially cis-oleic acid. In addition, *H. illucens* oil is characterized by a prevalent amount of lauric acid, a medium-chain fatty acid, and has a broad spectrum of activity against different bacteria *in vitro*

[94,115]. Matsue *et al.* [101] demonstrated that lauric acid itself did not inhibit *K. pneumoniae* ATCC4352 strain even at 2.5 Mm. Thus, a combination of FAs enhances the activity of AWME3 to kill MDR *K. pneumonie* strains at 250 µg/mL. Woz'niak *et al.*, 2010 [328] extracted FAs from fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum* that were less active against *K. pneumoniae* ATCC 13883 with MIC 0.5- 4 mg/mL, compared to AWME3 MIC 250 µg/mL. The quantity and quality of fatty acids, especially in *H. illucens* larvae, can differ with the progression of the larval instars and the use of different rearing substrates [279]. However, BSFL oil always contains a good quantity of lauric acid. Poly USFAs and free fatty acids have also been identified as antimicrobials with a broad spectrum of activity not affected by classical resistance mechanisms [96,329,330].

5.3. Determination of the MIC50 values of AWME3 extract against *K. pneumoniae* strains

MIC50 values of the AWME3 and the positive control against human *K. pneumoniae* strains are shown in Table 16 and Figure 21.

Table 16. MIC50 values of AWME3 and positive control against MDR *K. pneumoniae* strains

Bacteria strains	MIC50 (µg/mL)			
	Positive Control		AWME3	
	12 h	24 h	12 h	24 h
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-2473	2.1±0.03	2.17±0.024	126±0.045	149.5±0.013
<i>K. pneumoinae</i> KPM9	0.942±0.014	1.52±0.017	169.2±0.006	160.1±0.008
<i>K. pneumoniae</i> KPi1627	0.56±0.046	0.94±0.015	157.1±0.021	155.6±0.009

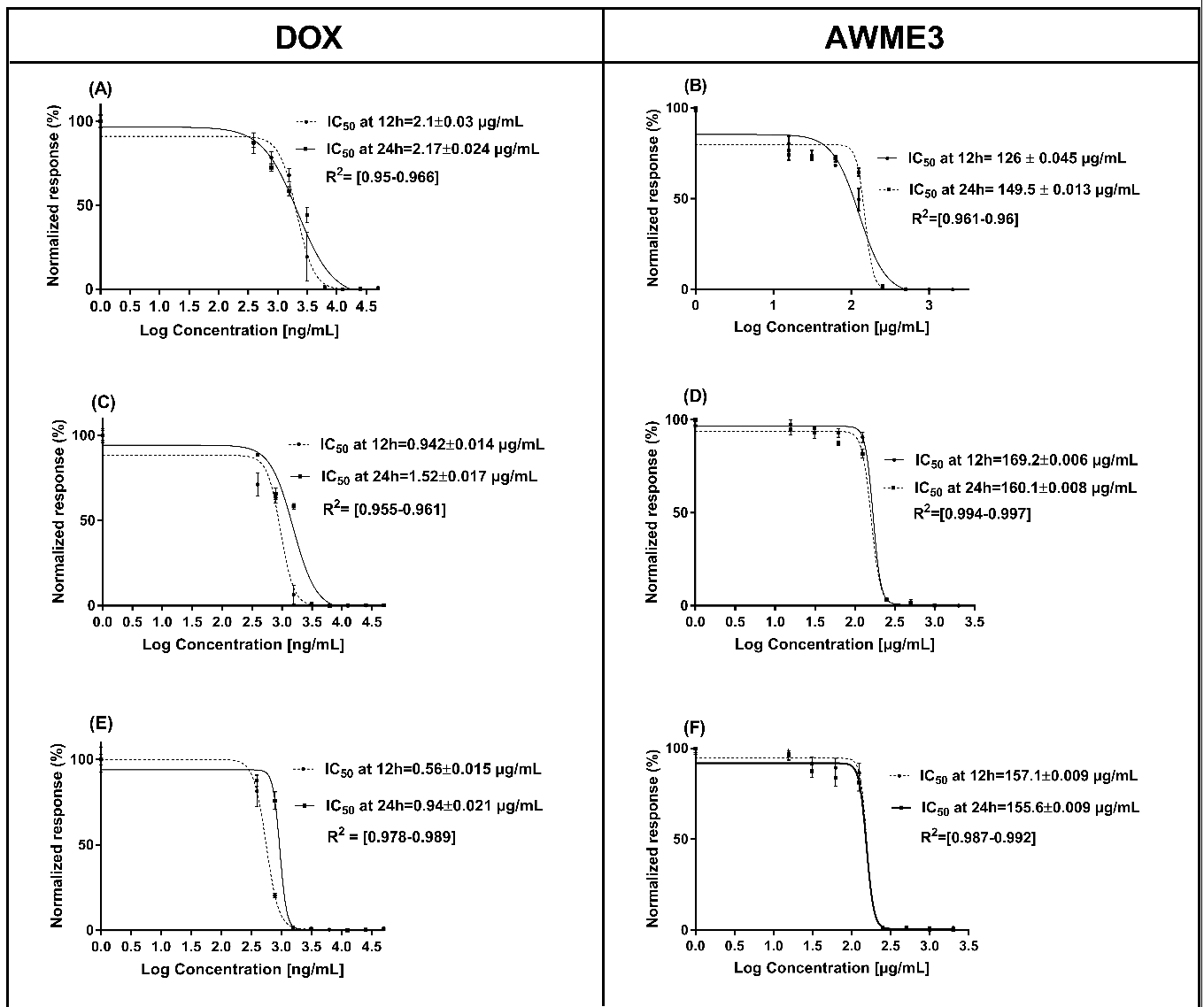


Figure 21. The MIC₅₀ (IC₅₀ value in the figure legends) of *K. pneumoniae* strains treated with AWME3 from the larvae fat compared to the doxycycline (Dox) as a positive control. The MIC₅₀ values were calculated based on the turbidimetric assay data and compared to the positive control (Dox). The planktonic bacteria turbidity was assessed for (A, B) *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473; (C, D) *K. pneumoniae* KPM9; (E, F) *K. pneumoniae* KPi1627 strains at 12 h and 24 h incubation with (A, C, E) Dox; (B, D, F) AWME3. The MIC₅₀ values were calculated using the non-linear regression mode of Graph Pad Prism 7 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The (IC₅₀) MIC₅₀ values are the average of three independent experiments ± standard deviation error mean (SEM).

AWME3 showed MIC₅₀ values ranging from 149.5±0.013 to 160.1±0.008 µg/mL after 24 h of incubation against all tested bacteria strains. Of note, MIC₅₀ values of AWME3 decreased from 12 h (169.2±0.006-157.1±0.009 µg/mL) to 24 h (160.1±0.008-155.6±0.009 µg/mL) against *K. pneumoniae* KPM9 and *K. pneumoniae* KPi1627 strains, respectively. AWME3 activity was more potent than those reported by Saviane and colleagues [320], where MIC₅₀ values against *K. pneumoniae* strain were 22.37

mg/mL and 39.28 mg/mL at 12 h and 24 h, respectively. The MIC₅₀ values of the doxycycline increased by 60% from 12 h to 24 h against clinical KPi1627 and environmental KPM9 isolates, while the reference strain KP ATCC BAA-2473 demonstrated only a 10% MIC₅₀ increase (Table 16, Figure 21). *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 was the most resistant to different concentrations of the positive control (Dox) compared to both wild-type *K. pneumoniae* isolates (Table 16). AWME3 possessed significant concentration-dependent inhibition, indicating high efficacy against MDR *K. pneumoniae* strains.

5.4. Assessment of human bacterial pathogens resistance to AWME3 treatment

The antibacterial resistance was determined by sub-culturing of the tested MDR bacteria strains with the sub-MIC (0.125 MIC, 0.5 MIC) concentration of the AWME3, or antibiotic for 16 consecutive days. The development of antimicrobial resistance is defined as more significant than a 4-fold increase to its initial MIC [331]. Our results demonstrated that the MIC values of AWME3 remained unchanged for tested bacteria strains, including *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, *K. pneumoniae* KPM9, and *K. pneumoniae* KPi1627, indicating that the human pathogens did not acquire resistance to the active compounds from the AWME3 extract (Figure 22). In contrast, serial passaging of all tested bacteria strains treated with reference antibiotic (P/S) showed more than 4-fold higher than the initial MICs (Figure 22), demonstrating a significant increase in antibiotic resistance. Indeed, the P/S initial MIC (9.77 µg/mL) raised to 256 MIC (2500 µg/mL) for *K. pneumoniae* KPi1627, and *K. pneumoniae* KPM9 strains. For *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, strain resistance increased more than 4 MIC (> 5000 µg/mL) from the initial MIC (1250 µg/mL). Thus, *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473, *K. pneumoniae* KPM9, and *K. pneumoniae* KPi1627 do not develop resistance in response to AWME3 extended treatment. Our results were in line with several studies, which proved that MDR bacteria strains did not induce any resistance to FAs, or its derivatives, while these microorganisms induce high resistance towards the different categories of antibiotics [332,333].

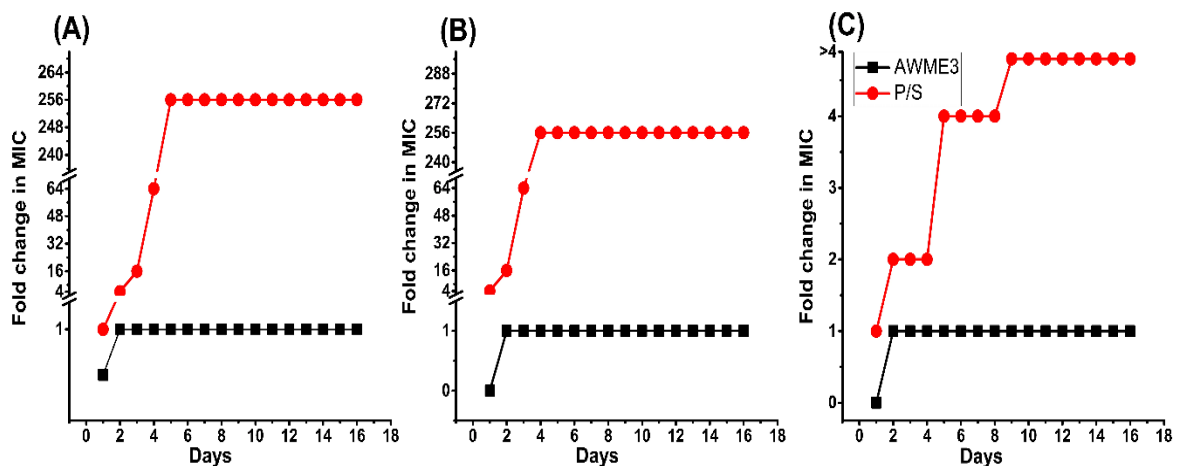


Figure 22. *Klebsiella pneumoniae* strains resistance assessment. Resistance acquisition monitored during 16 serial passages (16 days) in the presence of sub-MIC (0.125 MIC, 0.5 MIC) of AWME3, and positive control (P/S) for (A) *K. pneumoniae* KPi1627, (B) *K. pneumoniae* KPM9 and (C) *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473. The Y-axis represents the highest bacterial concentration during cell passaging. The figures are representative of three independent experiments.

5.5. Cytotoxicity of AWME3

The assessment of AWME3 sequentially extracted from *H. illucens* larvae fat for potential cytotoxicity (Figure 23A, B) is considered as an important step to evaluate its properties for further applications. The cytotoxic effect of AWME3 at 7.813–1000 $\mu\text{g/mL}$ concentrations was investigated using human HEK-293 cells by MTT cell viability assay, which relies on mitochondrial metabolic capacity of viable cells. It is obvious that the cell viability decreased with the increased concentration of extract. The AWME3 was toxic at higher than 500 $\mu\text{g/mL}$ concentration. However, the cells exposed to lower extract concentrations (250 $\mu\text{g/mL}$) retained higher than 70% of the cell viability. The cytotoxic activity of AWME3 is capable of killing human pathogenic bacteria strains at low concentrations, but it did not kill eukaryotic HEK-293 cell.

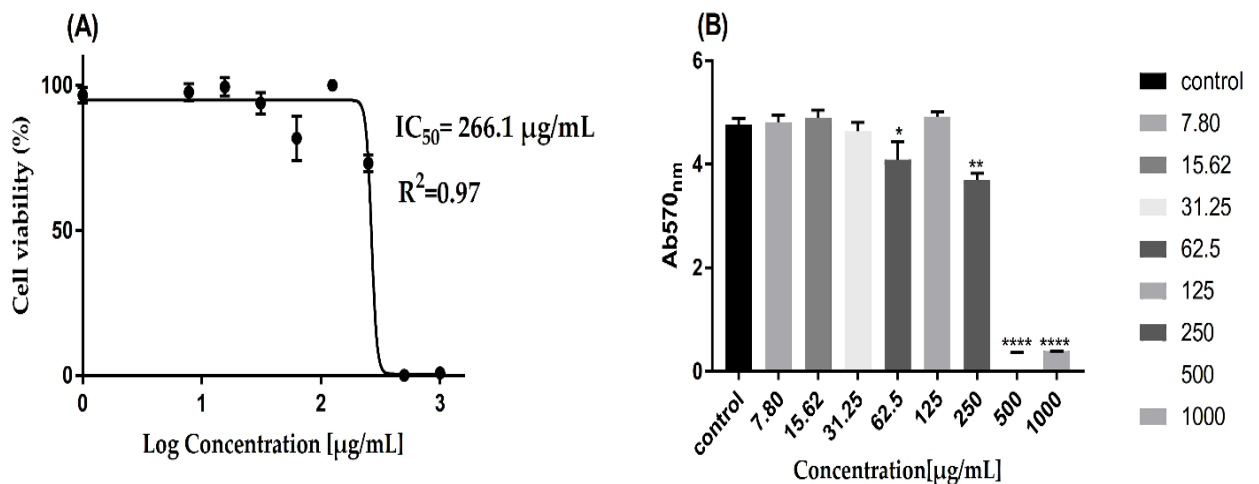


Figure 23. Cytotoxicity of AWME3 on human HEK-293 cell lines. Cells were treated with serial of AWME3 dilutions for 24 h. Then, viability of AWME3-treated cells was measured using MTT assay, where, **(A)** cell lines were treated with AWME3 for 24 h (X-axis: log concentrations of AWME3 extract from 0 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ and Y-axis: the percentage of normalized absorbance). **(B)**: the of average OD_{570} of the HEK-293 cell line treated with AWME3 for 24 h (Y axis: the normalized absorbance of HEK-293 at OD_{570}), X-axis: AWME3 concentrations from 0 to 1000 $\mu\text{g/mL}$, one way ANOVA used to analyse the means statistically, and Dunnett's multiple comparisons test used to find the significant difference ($p < 0.05$). The IC_{50} values were calculated using the non-linear regression mode of Graph pad Prism7

(Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). All Results are the mean (\pm SEM) from three independent experiments performed in triplicates (n=8).

The reports of AMPs extracted from *H. illucens* larvae to be safe for normal human cell lines [334], as well as the fact that MICs of *H. illucens* larvae extract against *E. coli* and *S. aureus* were lower than those to normal animal cells were in line with our results [335]. Four Cameroonian plant extracts showed no toxicity, when they were incubated for 48 h with HEK-293 normal human kidney cell lines [336]. Lipids extracted from brains of silver carp have protective effects against oxidative damage in human HEK-293 cells [234].

Chapter 6. AWME3 from *H. illucens* larvae fat disrupts and eradicates biofilms formed by hypermucoviscous *K. pneumoniae* strains

6.1. Biofilm formation

The formation of biofilm is a complex and dynamic process, including primary attachment of bacterial cells to biotic or abiotic substratum, following with physiological changes within the formation of microbe microcolonies of adhered cells after bacteria multiplication and finally biofilm maturation [337]. Biofilm formed by hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKp) strains enhances the virulence of pathogenicity and invasiveness of infection through colonization in respiratory, gastrointestinal, and urinary tracts [338]. During the biofilm formation, exopolysaccharides are produced by bacterial cells forming a matrix around the cells to protect them from the harsh environmental conditions and exposure to bioactive agents. When exopolysaccharides across the inner membrane and subsequent translocated to the cell surface are mostly mediated by efflux pumps [339,340], deducing that inhibition of efflux activities may strongly disrupt the formed biofilm of hvKp [340].

We performed the biofilm assay using LB broth medium in 96-microtiter plate. Based on these measurements for the CV dye, we found that all strains of KPi1627, KPM9, and KP ATCC-BAA2473 formed strong biofilm (Figure 24).

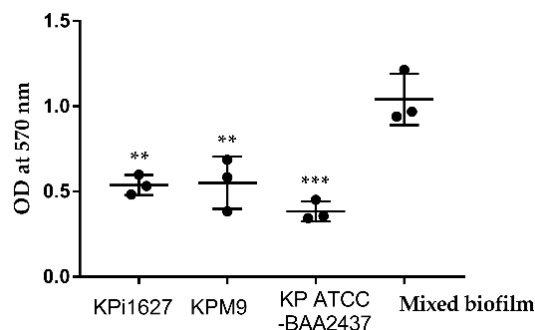


Figure 24. Biofilm formation quantitation of hvKp strains formed on polystyrene microtiter plates (static conditions) after 24 h. Biofilm measured by crystal violet at 570 nm (optical density, OD₅₇₀). Biofilm production by each isolate was scored as either strong (BF \geq 0.300), moderate (BF=0.200-0.299), weak (BF=0.100-0.199), or negative (BF<0.100). Data were analysed by the one-way ANOVA test with Tukey's multiple comparison test. Results are indicated as means \pm SDs. Asterisks indicate statistical significance (**p=0.003, ****p<0.0005), when different bacteria strains (KPi1627, KPM9, KP ATCC-BAA2473) compared to mixed biofilm of these strains.

Mixed biofilm established by equal volumes (1:1:1) of the three different strains was the strongest one compared to biofilms formed by *K. pneumoniae* strains followed by KPM9, KPi1627 (p=0.003). On the other hand, KP ATCC-BAA2473 was the lowest (p=0.0005) in biofilm formation compared to mixed biofilm (Figure 24). In addition, all tested bacteria were MDR pathogens [233,341] comparing bacteria

strains with their antibiotics resistance, moreover it was found that all strains had the ability to form strong biofilms were resistant, and these findings were in agreement with several issues [140,342,343].

6.2. Effect of AWME3 on biofilm formation factors

6.2.1. Aggregation and precipitation assays

It is well known that the transformation from planktonic cells phenotype to the sessile form occurs as response to environmental changes. These changes, such as temperature, nutrient level, pH, and ionic strength, which influence biofilm formation. These factors can effect on the bacterial adhesion, cell surface properties that includes hydrophobicity, motility, flagellation, and surface properties, such as hydrophobicity and roughness. Additionally, bacterial cell surface properties, including extracellular appendages, such as flagella, fimbriae, and the interactions involved between cells such as quorum sensing [344].

The MIC and MBC of AWME3 were determined previously against planktonic three isolates of *K. pneumoniae* (KPi1627, KPM9, KP ATCC-BAA2473) [345]. The MIC and MBC of AWME3 recorded 250 $\mu\text{g/mL}$ against these strains, when they were incubated under shaking at 200 rpm/min for 24 h.

Autoaggregation might contribute to biofilm formation [346]. The autoaggregative behaviour of mucoid strains was carried out over 24 h at room temperature. High percentage of aggregation of treated and untreated bacteria was obvious (Table 17, Figure 25A).

Table 17. Effect of AWME3 on the autoaggregation of *K. pneumoniae* strains

KPi1627		KPM9		KP ATCC	
Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
98.2 \pm 2.3	99.9 \pm 0.9	99.7 \pm 0.28	98.4 \pm 0.74	98.6 \pm 1.87	97.05 \pm 4.3

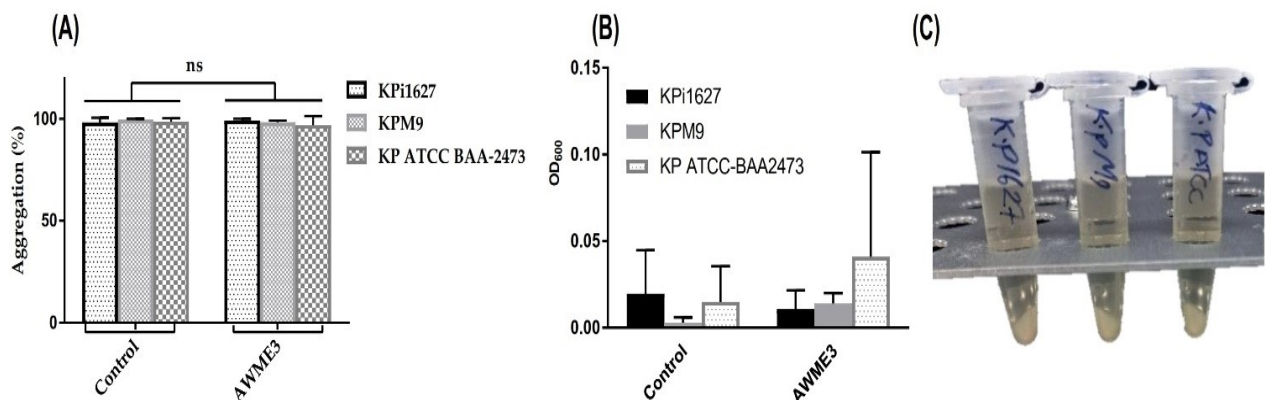


Figure 25. Aggregation, mucoviscosity, and precipitation assays of *K. pneumoniae* strains. Strains of KPi1627, KPM9, and KP ATCC BAA-2473 were cultured in LB broth overnight at 37 °C. Bacterial cells were treated with 0.5 MIC (0.125 mg/mL) of AWME3 did not show any turbidity with low optical density of bacterial supernatant, which was non mucoid (A, B), when centrifuged for 10 minutes at low speed (1000 ×g), and high precipitation of treated and untreated strains with dense pellets were formed (C).

Auto-aggregation performed at static condition at room temperature and it was not significantly ($p=0.995$, $p=0.971$, $p=0.945$) affected by 0.5 MIC (0.125 mg/mL) of AWME3 against KPi1627, KPM9, and KP ATCC BAA-2473 strains, respectively (Figure 25A). In addition, the optical density of the treated cells was measured to determine the turbidity formed after centrifugation showing non-significant changes in the treated bacteria, compared to control group (Figure 25B). All bacteria strains of *K. pneumoniae* were tested for their ability to form dense pellet by centrifugation, wherein none of them were found forming the loose pellet, all strains formed dense pellet (Figure 25C). These results show that AWME3 did not affect significantly on the *K. pneumoniae* strains pellet formation, when treated with 0.5 MIC (0.125 mg/mL), compared to the untreated cells. These findings were in accordance with Song *et al.* [347] who studied the effect of grapefruit extract on autoaggregation of some pathogenic bacteria strains.

6.2.2. String test

We performed the string test as an initial assessment of *K. pneumoniae* virulence [348]. Our results showed that KPi1627 and KPM9 were positive (had a string longer than 5 mm), while KP ATCC BAA 2473 was negative (< 5 mm) for the string test. KPi1627 was the most significant ($p<0.0001$) hypervirulent mucoviscous strain among other bacteria, where it recorded 51.7 ± 3.5 mm, while KPM9, and KP ATCC BAA-2473 were 31 ± 3.63 mm, and 3.81 ± 1 mm, respectively. All treated isolates lose their mucoviscosity, when they exposed to sub-MIC (0.125 mg/mL) of AWME3, compared to control groups (Table 18, Figure 26). Most of hvKp strains typically possess a thick, hyper mucoid capsule and therefore produce mucoid colonies that generate a positive result in string test, therefore hypermucoviscous phenotype are mostly associated with hypervirulence [348]. The capsule is a key virulence factor that enhance hvKp to be resistant to different antibacterial agents and able to form a biofilm, which in turn confers resistance to antibiotics and starvation stress [349,350]. Lev *et al.* [233] reported that KPM9 and KPi1627 have capsular type K20 and K2, respectively. Furthermore, classical *K. pneumoniae* strains are able to acquiring hypermucoviscosity and producing the capsule through obtaining the virulence plasmid by conjugation [351,352].

Table 18. Effect of 0.5 MIC of AWME3 on the hypermucoviscosity of *K. pneumoniae* strains

Strain	KPi1627	KPM9	KP ATCC-BAA2473
string length (mm)			

Control	51.7±3.5	31±3.6	3.83±1
Treated	0.0	0.0	0.0

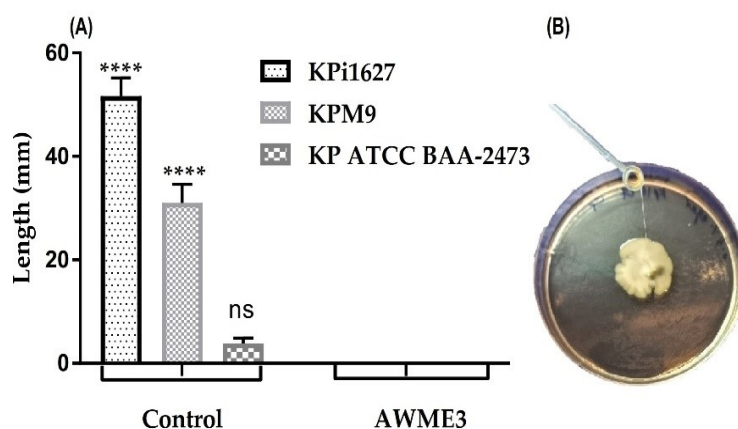


Figure 26. String test for *K. pneumoniae* strains. Bacterial strains were cultured on LB agar plates, incubated for 72 h, and then sterilized loop used to stretch the bacterial colony grown on the Petri dishes agar. All strains exposed to 0.5 MIC (0.125 mg/mL) of AWME3 and all treated colonies were negative for string test (A) compared to control group (B). The results are expressed as mean \pm STD of three independent experiments. A two-way ANOVA test and Tukey's multiple comparisons test was performed to determine the statistical significance (**** $p \leq 0.0001$).

6.2.3. Hydrophobicity assay

Hydrophobicity of the hydrocarbons plays a pivotal role for colonization, adhesion, and biofilm formation and it depends on the type of strain and organic solvent [353]. Alternatively, autoaggregation and hydrophobicity by themselves might contribute to reduce carbapenem susceptibility [354]. The tested bacteria showed different degrees of hydrophobicity. Table 19 indicated the highest adhesion ability was observed in chloroform, followed by ethyl acetate, toluene, while the lowest adhesion was observed in hexane (chloroform > ethyl acetate > toluene > hexane).

Table 19. Hydrophobicity (%) of three *K. pneumoniae* strains isolated from different sources and treated with 0.5 MIC of AWME3

Hydrocarbons	KPi1627		KPM9		KP ATCC BAA-2473	
	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
Chloroform	36.31±2.84	64.9±6.26	44.85±2.03	38.3±2.37	35.99±1.37	44.28±1.7
Hexane	2.42±3.25	10.6±2.9	6.62±5.9	6.62±2.96	1.09±2.7	24.72±4.75
Ethyl acetate	32.46±13.9	31.05±5.9	31.85±13.97	34.87±12.36	23.99±6.42	44.6±4.25
Toluene	31.19±1.06	33.76±4.3	19.42±4.4	37.55±2.86	41.84±12.28	62.2±1.1

According to control groups, KPM9 showed the highest adhesion to chloroform and hexane (44.85%, 6.62%) followed by KPi1627 (36.31%, 2.42%) and KP ATCC-BAA2473 (35.99%, 1.09%) (Table 19, Figure 27). The highest percentage of KPi1627 adhesion (32.46%) was recorded in the presence of ethyl acetate, followed by KPM9 (31.85%), and KP ATCC-BAA2473 (23.99%) as illustrated in Table 19, and Figure 27. The highest adhesion of KP ATCC-BAA2473 towards toluene was 41.84%, compared to KPi1627 and KPM9, which their adhesions were 31.19%, and 19.42%, respectively. We investigated the hydrophobicity by assessing the pathogen adhesion to four selected different hydrocarbons in the presence of AWME3 at 0.5 MIC (0.125 mg/mL) to determine the influence of AWME3 on the bacterial adhesion. AWME3 isolated from BSFL fat increased the cell surface hydrophobicity significantly ($p < 0.0001$, $p=0.0004$) in KPi1627, and KPM9, respectively, but did not have a significant increase in KP ATCC-BAA2473 (Table 19, Figure 27A). On the other hand, KP ATCC-BAA2473 showed the highest significant increase ($p < 0.0001$, $p=0.009$) in adhesion in the presence of hexane and ethyl acetate, respectively, when this strain subjected to 0.5 MIC of AWME3 (Table 19, Figure 27B, C). All treated bacteria strains did not display significant increase in hydrophobicity of toluene, furthermore both treated KPi1627 and KPM9 exhibited non-significant increase in adhesion towards ethyl acetate solvent (Table 19, Figure 27C). Thus, AWME3 concentration of 0.5 MIC (0.125 mg/mL) did not affect the cell surface hydrophobicity of KPi1627 and KPM9 in the presence of hexane, ethyl acetate, and toluene (Figure 27B, C, D). The most interesting that AWME3 reduced cell surface hydrophobicity or adherence significantly in KPM9 ($***p= 0.0004$) as shown in Figure 27A. These results were in line with several studies [347,355–357]. From the above-mentioned results, KPi1627 and KPM9 are a better donor electron than recipient because it shows greater adhesion in the presence of chloroform. No adhesion or hydrophobicity of *K. pneumoniae* strains was observed in the presence of hexane (Figure 27B).

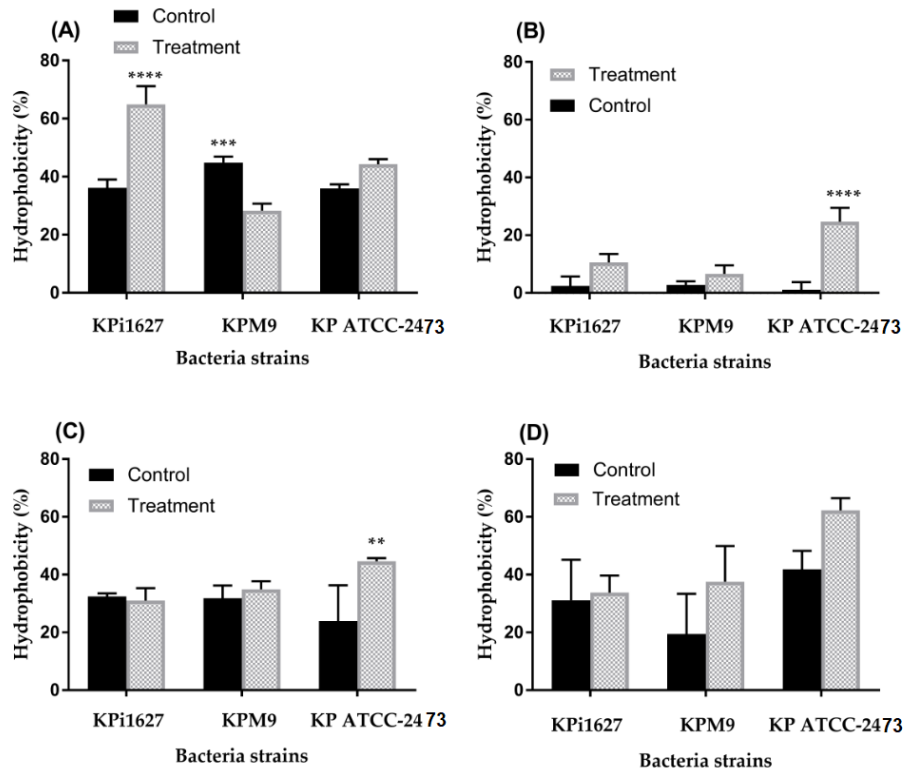


Figure 27. The effect of 0.5 MIC (0.125 mg/mL) of hydrophobicity activity of KPi1627, KPM9, and KP ATCC -2473 against different hydrocarbons, (A) chloroform, (B) hexane, (C) Ethyl acetate, and (D) toluene. Data are mean values \pm STD ($n = 3$). Data were analysed by two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons test, p-value was ranged between $**p = 0.009$ and $****p < 0.0001$.

6.2.4. Effect of AWME3 from BSFL fat on *K. pneumoniae* strains motility

Motility is essential for bacterial colonization of biotic or abiotic surfaces; it helps microorganisms to move toward environment that are more favourable and away from harsh conditions. Motility is also important characteristic for the bacterial pathogenicity due to its influence on host cell adhesion, colonization, and biofilm formation [358]. Although *K. pneumoniae* known to be non-motile Gram-negative rod bacilli, Lima and León-Izurietta [359] showed that *K. pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis has polar flagella. Furthermore, he described a swim-like motility phenotype generated by flagella in these clinical isolates; the hyperfimbriated phenotype provides a kind of rudimentary motility. Additionally, the *K. pneumoniae* genome has *flk* gene that encodes a regulator of flagella biosynthesis. Thus, the limited movement, which is observed in the mutant strain resulted from type 1-like fimbriae production or KpfR regulator, enhance the expression of flagellar genes. Sharma *et al.* [360] studied comparative proteomics and systems biology to determine the correlation between the decrease of motility-related proteins (flagella, fimbriae, and pili) and the biofilm formation, which may lead to the development of drug resistance.

It is known that several FAs mimic virulence factors and control motility, fimbriae, hyphae, and biofilm development of diverse microbes, therefore oleic acid as FAs inhibited swarming motility and pyocyanin production in *P. aeruginosa* [361]. We evaluated the sub-MIC (0.125 mg/mL) effects of AWME3 on the three types of *K. pneumoniae* strains on its primitive motility, including swimming, swarming, and twitching, measured in diameter (mm). As shown in Table 20, AWME3 extract exerted distinct effects on the primitive motility among *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9, and KP ATCC-BAA2473 strains, where AWME3 significantly reduced swimming ($p = 0.0025$, $p < 0.0001$) of KPM9, and KP ATCC-BAA2473 strains, respectively. On the other hand, no significant effect of 0.5 MIC (0.125 mg/mL) of AWME3 on KPi1627 primitive motility (Figure 28, Figure 29A) was obvious. The motility of MDR KPM9, and XDR KP ATCC-BAA2473 strains was significantly reduced ($p=0.007$, $p=0.003$) after exposing to 0.5 MIC (0.125 mg/mL) of AWME3, while KPi1627 was not influenced after treatment (Table 20, Figure 28, Figure 29B). A great significant reduction ($p < 0.0001$) in motility zone diameters of all *K. pneumoniae* strains when they were subjected to sub-MIC (0.125 mg/mL) of AWME3 (Table 20, Figure 28, Figure 29C). These results indicate that AWME3 probably targeting the quorum-sensing pathway in these bacteria strains of KPM9, and KP ATCC-BAA2473, thereby inhibiting the biofilm formation and bacterial infections. All zone diameters of twitching motility of all tested bacteria strains were reduced by about 50% when exposed to sub-MIC of AWME3, where treated KPi1627, KPM9, and KP ATCC BAA-2473 recorded (4.23 ± 0.25 mm, 4.5 ± 0.5 mm, 4.47 ± 0.25 mm), compared to control groups (8.5 ± 0.5 mm, 9.3 ± 0.61 mm, 10.5 ± 0.5 mm), respectively (Table 20, Figure 28, Figure 29C). These findings were in line with the previous studies, which reported that natural product extracts decreased significantly the swimming and swarming motility of different human pathogens strains [347,355,362].

Table 20. Swimming, swarming, and twitching motility in MDR *K. pneumoniae* strains, including clinical isolate KPi1627, environmental isolate KPM9, and laboratorial isolate KP ATCC-2473 in the presence and absence of AWME3 at 0.5 MIC

Motility	KPi1627		KPM9		KP ATCC-BAA-2473	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
Swimming	6±0.5	5.23±0.25	7.5±0.5	5.57±0.4	8.9±0.36	5.3±0.35
Swarming	8.5±0.5	7.43±0.4	8.83±0.76	7.1±0.36	9.43±0.4	7.4±0.4
Twitching	8.5±0.5	4.23±0.25	9.3±0.61	4.5±0.5	10.5±0.5	4.47±0.25

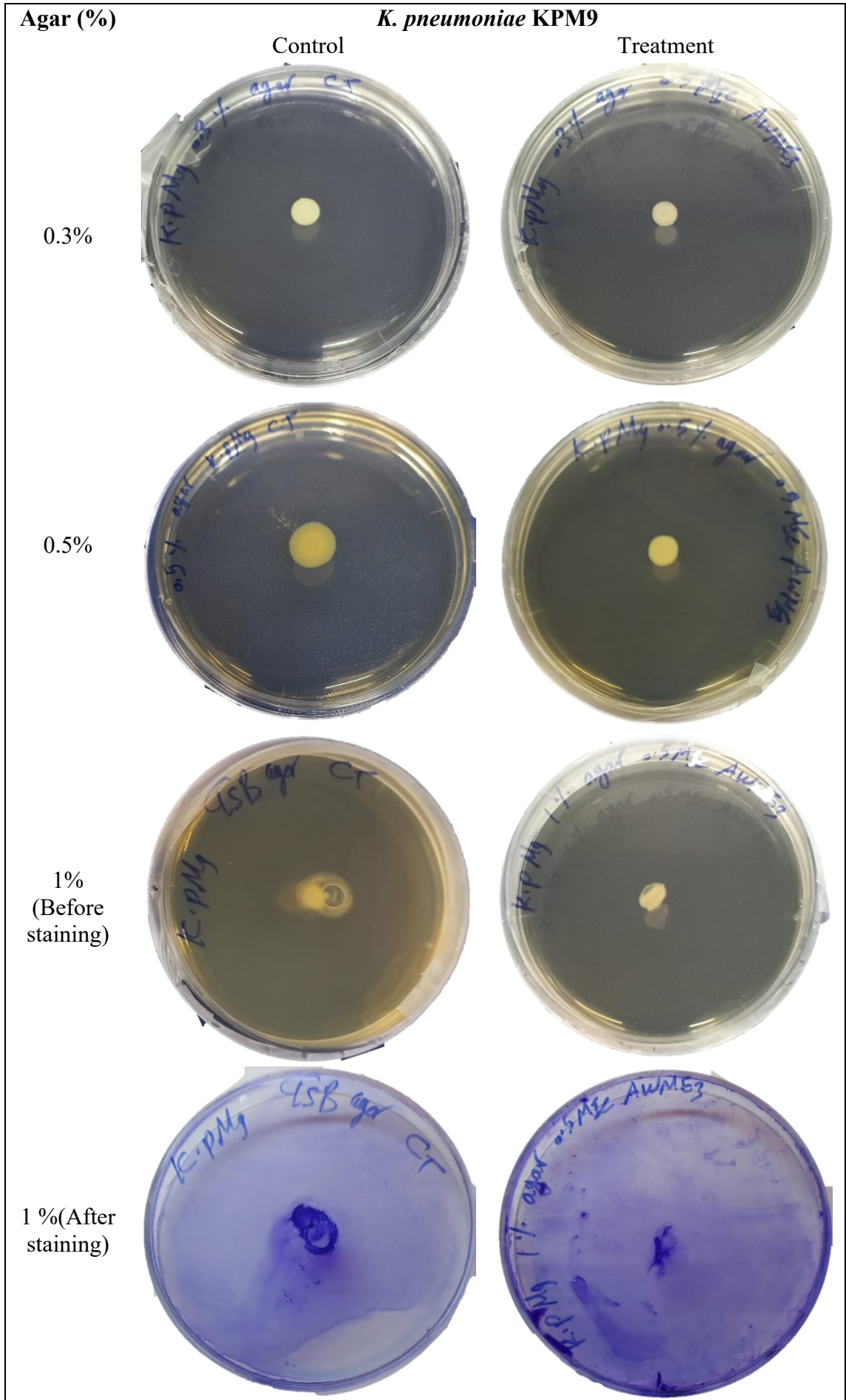


Figure 28. Swimming (0.3% agar), swarming (0.5% agar), and twitching motility (1% agar) in MDR-*K. pneumoniae* strains, environmental isolate KPM9 as representative strain in the presence and absence of AWME3 at 0.5 MIC (0.125 mg/mL).

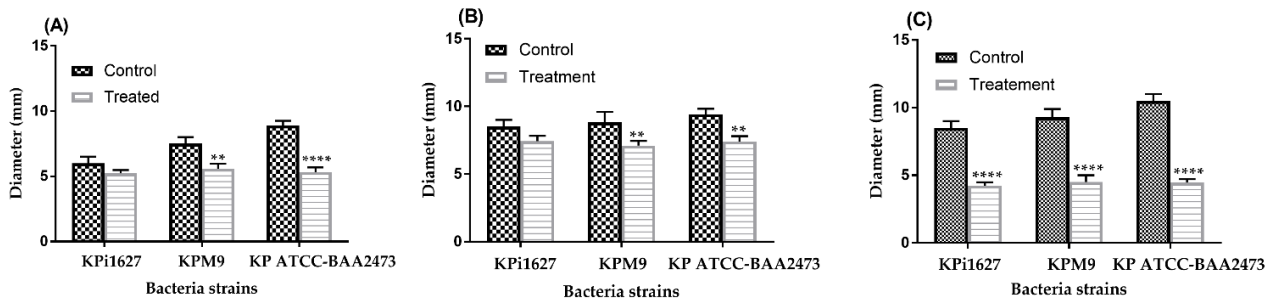


Figure 29. *K. pneumoniae* strains motility in the absence (control) and presence of AWME3 extracted from HI larvae fat. (A) Mean swimming motility, (B) mean swarming motility, and (C) mean twitching motility of KPi1627, KPM9, and KP ATCC-BAA2473 isolates. Data are mean values \pm SD ($n = 3$). Data were analysed by two-way ANOVA, followed by Sidak's multiple comparisons test, p-value was ranged between ** $p = 0.003$ and **** $p < 0.0001$.

6.3. Eradication of single and mixed biofilm established by MDR *K. pneumoniae* strains

Biofilms are well constructed as bacterial colonies accumulate in multiple layers on biotic or abiotic material that facilitate survival and persistence against harmful conditions, as well as contribute to virulence during infection. The *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9, and KP ATCC-BAA2473 strains were able to form strong biofilm (Figure 30). The effects of FAs of AWME3 isolated from HI larvae fat on biofilm formation by *K. pneumoniae* strains were assessed *via* a crystal violet method (Figure 30).

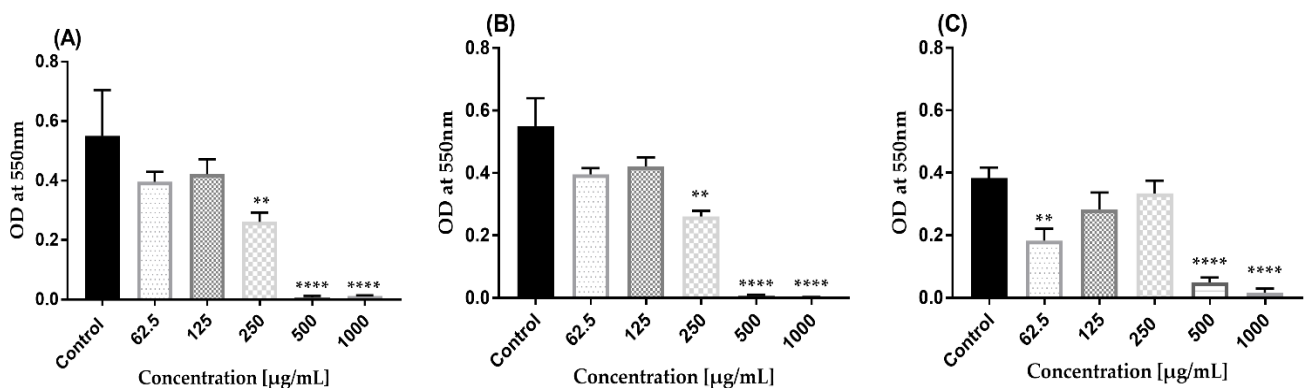


Figure 30. Bactericidal effect of AWME3 against preformed biofilms of all tested *K. pneumoniae* (A) KPi1627, (B) KPM9, and (C) KP ATCC-BAA2473 strains. Overnight cultures were pelleted, washed, resuspended in LB broth media and inoculated in 96- microtiter plates at final suspension (OD \sim 0.1). Each bacterial culture was grown in the presence of different concentration of AWME3 (1000, 500, 250,

125, 62.5 µg/mL). After 24 h of incubation, the biofilm was detected using crystal violet stain followed by 33% acetic acid treatment. The OD₅₅₀ absorbance was measured using a CLARIOstar microplate reader. The experiments were performed in triplicate with independent cultures, and statistical significance was examined by the one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison test. Results are indicated as means ± SDs. Asterisks indicate statistical significance (**p =0.001, ****p < 0.0001).

The assay was performed in LB broth media. In the crystal violet staining assay, all *K. pneumoniae* strains were significantly inhibited (p < 0.0001) at MBIC (0.5 mg/mL) and 2 MBIC (1.0 mg/mL), while KPi1627 and KPM9 were significantly reduced (p=0.001) at 0.5 MBIC (0.25 mg/mL) of AWME3 (Figure 30A, B). The most interesting that the biofilm of KP ATCC-BAA2473 strain was significantly reduced (p=0.007), when it was exposed to 0.125 MBIC (0.0625 mg/mL) of AWME3 (Figure 30C). Furthermore, the MBIC and MBEC for AWME3 and positive control (Dox) were determined based on the microdilution assay in 96-well plate under static conditions, where MBIC was identified as the lowest concentration of AWME3, or Dox that inhibit the bacterial biofilm growth. The MBEC was also determined based on the MBIC values, where aliquots of 30 µl of MBIC, 2MBIC, and 4 MBIC was cultured on MH agar plates and incubated for 48 h at 37 °C. The MBIC and MBEC recorded 500 µg/mL against the *K. pneumoniae* strains, when they were incubated at static condition to establish biofilm adherent to polystyrene microtiter plates (Table 21). Doxycycline (Dox) used as positive control in this study and it exhibited bacteriostatic properties with MBIC >50µg/mL) against *K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9, and *K. pneumoniae* ATCC-BAA2473, respectively. These results demonstrated all bacterial isolates were more resistant in adherent condition compared to planktonic cells, which were incubated under shaking condition. Furthermore, AWME3 extract showed bactericidal activity against all biofilms formed by *K. pneumoniae* strains, compared to the standard antibiotic (Dox), which showed bacteriostatic activity.

Table 21. Biofilm eradication of *K. pneumoniae* strains by AWME3

Incubation condition	Agent	Concentration (µg/mL)			
		KP ATCC BAA-2473	KPM9	KPi 1627	
Static (adherent cells)	AWME3	MBIC	500	500	500
		MBEC	500	500	500

Static (adherent cells)	Dox	MBIC	3.13	6.25	12.5
		MBEC	>50	>50	>50

Mixed biofilm formed by these three MDR *K. pneumoniae* pathogens that are often cause nosocomial infection in hospitals. The activity of our extract AWME3 was evaluated against mixed biofilms established by these virulent strains. Figure 31 shows the eradication of mixed biofilms formed by three *K. pneumoniae* strains at dose dependant manner, where 2 MBIC (1000 µg/mL) of AWME3 eradicated completely ($p < 0.0001$) the mixed biofilms formed by KP1627, KPM9, and KP ATCC-BAA2473 (Figure 31).

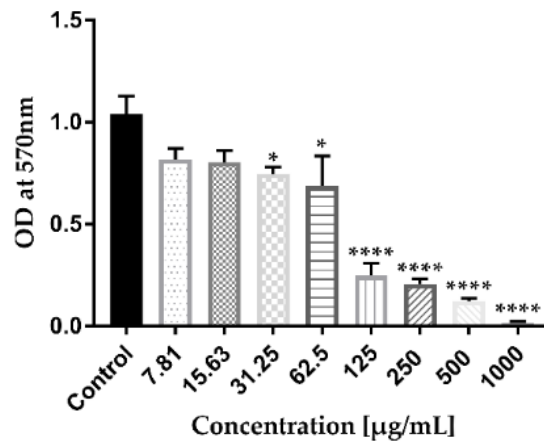


Figure 31. Mixed biofilm growth eradication and inhibition developed by a mixture of three different MDR *K. pneumoniae* strains. All tested strains of KP1627, KPM9, and KP ATCC-BAA2473 were cultured separately on LB broth medium, incubated overnight, washed, pelleted, mixed together with equal volumes (1:1:1) at bacterial suspension (OD=0.1) in 96-microtiter plate. Next, final concentrations (7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) of AWME3 were serially diluted in 2 fold dilution in LB broth, then aliquot of 100 µl of mixed bacteria strains were added and mixed with AWME3. The microtiter plates were sealed, and then incubated without shaking at 37 °C for 48 h. The dose response inhibition was demonstrated by a crystal violet assay, AWME3 showing the inhibition of the mixed biofilms in a dose response manner. Results are the average of three independent experiments \pm SDs. Asterisks indicate statistical significance (* $p = 0.010$, **** $p < 0.0001$) analysed by one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison test.

It is obvious that concentrations 0.25 MBIC (125 µg/mL), 0.5 MBIC (250 µg/mL), MBIC (500 µg/mL), and 2 MBIC (1000 µg/mL) have a great significant effect ($p < 0.0001$) to inhibit the mixed biofilms (76.3%, 80.01%, 88.2%, 98.56%), respectively. Furthermore, low concentration of our extract AWME3 reduced significantly ($p = 0.010$, $p = 0.038$) the mixed biofilms at 1/16 MBIC (62.5 µg/mL) and 1/32 MBIC (31.25 µg/mL) to record 28.3%, and 33.97%, respectively against mixed hvKp strains

(Figure 31). Altogether, results have provided evidence that AWME3 extract from BSFL fat has an effective antimicrobial potential against single or mixed biofilm established by different strains of MDR *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9, and XDR KP ATCC-BAA2473, further at the same time, it can inhibit the cell adhesion, which is responsible for controlling the formation of biofilms. Recently studies stated that single or combined fatty acids disrupt and eradicate biofilms formed by MDR pathogenic bacteria strains [97,361,363]. Our extract AWME3 shows high activity compared the extract of *Withania somnifera* seeds, which contains a large amount of fatty acids [362], therefore AWME3 was more potent than different essential oils used to disrupt New Delhi Metallo- β -Lactamase-1-producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* strains [364].

6.4. AWME3 eradicates mature biofilms established by MDR *K. pneumoniae* strains

Biofilm maturation requires a multistep process; whereas planktonic bacterial cells adhere initially with the surface via appendages or proteins, then formed microcolonies produce and secret extracellular matrix components, which are responsible for the formation of a 3D biofilm architecture. Finally, a mature biofilm is formed and needs dispersal to avoid maleficent overgrowth, nutrient shortage and accumulation of metabolic compounds. Mature biofilm was established by *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9, and *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 after 72 h of incubation under static condition. The AWME3 of HI larvae fat was tested against mature biofilms constructed by *K. pneumoniae* strains, where mature biofilms were completely eradicated at 1000 $\mu\text{g/mL}$ of AWME3. Thus, no bacterial growth was visualized after culturing the 30 μL of scraped biofilm on MH agar plates and incubated for 48 h, on the other hand the antibiotic (Dox) did not inhibit the mature biofilms even at 4000 $\mu\text{g/mL}$. In addition, mature biofilms quantified using the crystal violet assay to evaluate the activity of AWME3 extract against *K. pneumoniae* strains biofilms in 96-microplates. From the data shown in Figure 32, the results show that concentrations (250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/mL}$) of AWME3 significantly ($p < 0.0001$) disrupted and inhibited preformed *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9, and *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strains biofilms.

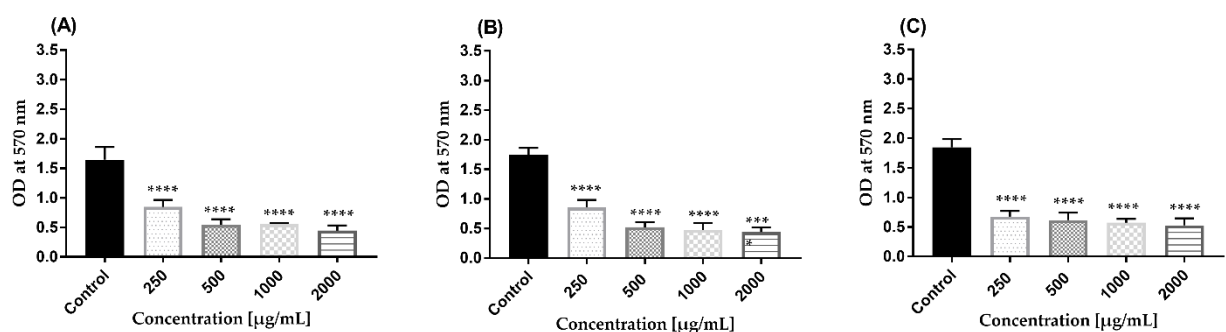


Figure 32. Effect of AWME3 from *H. illucens* larvae fat on pre-formed mature biofilms by *K. pneumoniae* strains (A) KPi1627, (B) KPM9, and (C) KP ATCC-BAA2473. Cells were cultured in LB broth for 48 h at 37 °C in 96-microtiter plates in static conditions. Planktonic cells were aspirated, LB broth media was changed every 24 h and different concentrations of AWME3 (250, 500, 1000, 2000 µg/mL) added to the pre-formed biofilm. The plate was further incubated for 24 h, after that it was washed to remove planktonic cells with PBS (pH=7.2±2). Remaining biofilm was stained using crystal violet staining and quantified at 570 nm. Results are the average of three independent experiments ± SDs. The statistical significance was calculated using analysis variance One-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison test. Asterisks indicate statistical significance ****p < 0.0001).

The effect of AWME3 could be observed for *K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9, and *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain, with a biofilm mass reduction of (48.6, 67.1, 66.1, 72.5%), (51, 70.1, 72.8, 74.9%), (63.1, 66.5, 68.9, 70.1%) at 250, 500, 1000, and 2000 µg/mL, respectively (Figure 32A, B, C). It is obvious that mature biofilms formed by *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain showed high susceptibility to AWME3, where the biomass was reduced to 63.1% when treated with 250 µg/mL (Figure 32C). From all mentioned above results, FAs and their derivatives in AWME3 extract were able to inhibit and eradicate the formation of the mature biofilms by different MDR hvKp strains. Previous studies stated that natural product in particular SFAs and PUSFAs were able to disrupt and inhibit mature biofilms established by *K. pneumoniae* strains [145,365,366].

6.5. Permeabilisation of bacterial cell membrane by AWME3

6.5.1. Bacteria cell membrane permeability

The *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 cells membrane permeabilisation by AWME3 was confirmed in this study by several assays, including cell membrane permeability, crystal violet-uptake, and ethidium bromide-uptake and represent a scope of evidents of cell membrane degradation and penetration targeted by AWME3.

Cell membrane permeability was determined based on the relative electric conductivity (REC). Figure 33 showed the effect of AWME3 on the REC of *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 strain.

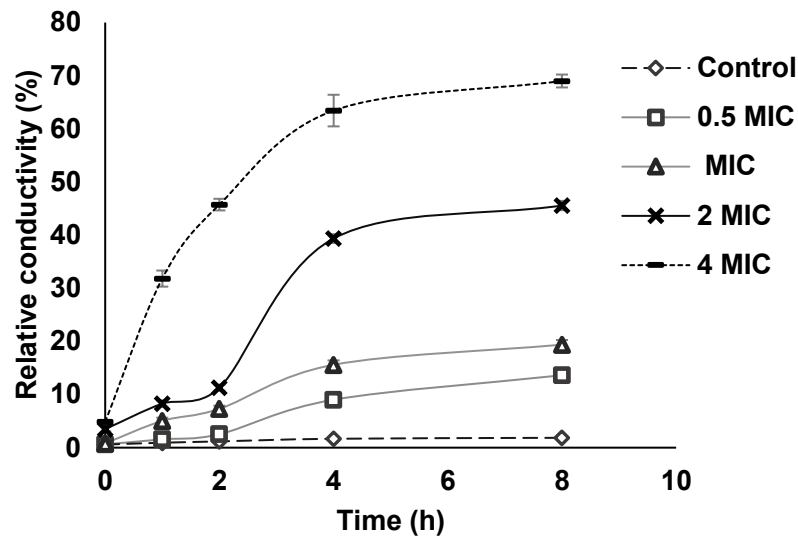


Figure 33. Effect of AWME3 concentrations on *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 cell membrane permeability. Planktonic bacteria suspension at 10^8 CFU/mL was subjected to various concentrations of AWME3 ranged from 0.5 MIC (125 $\mu\text{g/mL}$) to 4 MIC (1000 $\mu\text{g/mL}$), and incubated for 8 h at 37 °C. REC was calculated at 0, 1, 2, 4, and 8 h based on the values of electrical conductivity. Untreated AWME3 bacteria was considered as negative control. All values presented as the mean of three independent experiments \pm SD.

The REC of the control (non-treated) planktonic bacteria recorded a marginal increase, which might be as a result of the standard lysis and death of the bacteria. AWME3 treatment in the concentration range of 0.5 – 2 MIC demonstrated a biphasic effect on REC with a smooth lift by the second hour followed by a more pronounced increase by the fourth hour with almost flattened change within the next four hours. Indeed, The REC gradually increased within the first four hours, reaching a 1.5 fold rise to $13.62 \pm 1.29\%$ and $19.38 \pm 0.87\%$ against 0.5 MIC and 1 MIC, respectively by eight hours. More pronounced REC increase up to $45.57 \pm 0.87\%$, and $69 \pm 1.21\%$ was caused by the 2 MIC, 4 MIC, respectively, by the same incubation time. Notably, 4 MIC induced a rapid sharp increase by the first hour of incubation, recording REC $31.82 \pm 1.21\%$. By the eighth hour of AWME3 exposure, the REC of *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 at the control, 0.5 MIC, 1 MIC, 2 MIC, and 4 MIC were $1.86 \pm 0.12\%$, $13.62 \pm 1.29\%$, $19.38 \pm 0.87\%$, and $69 \pm 1.21\%$, respectively (Figure 33). Hence, the AWME3 dose-dependently increased REC of treated bacteria suggesting the leakage of bacterial electrolytes due to disruption of cell permeability caused by AWME3 treatments. The permeability of the bacterial cell membrane can be influenced by exogenous fatty acids, particularly those containing cis-isomers. Incorporating of the cis-UFAs such as linoleic acid (18:2) can disturb membrane dynamics, increasing membrane permeability. Furthermore, the first double bond location in the USFAs may significantly affect the membrane permeability [97]. Here, we demonstrated that the AWME3 FAs dose-dependently increased the relative conductivity of treated *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 bacteria suggesting the

leakage of intracellular bacterial electrolytes due to disruption of cell permeability caused by AWME3 treatment. Besides, Uppu *et al.*, 2017 [367] has stated that the membrane-active agents against *K. pneumoniae* and different Gram-negative bacteria strains acted through the disruption of bacterial membranes as a prime target for therapeutic attack. Thus, the observation in our study of *K. pneumoniae* membrane permeability induced by FAs from AWME3 is in a line with other published results.

6.5.2. Crystal violet uptake

Crystal violet (CV) has low penetration into intact cell membranes, while it could easily enter and pass through the damaged cell membrane [368]. We tested all *K. pneumoniae* strain by this assay and found that they displayed different behaviour towards CV uptake, which was evident to the activity of AWME3 against tested bacteria strains (Figure 34).

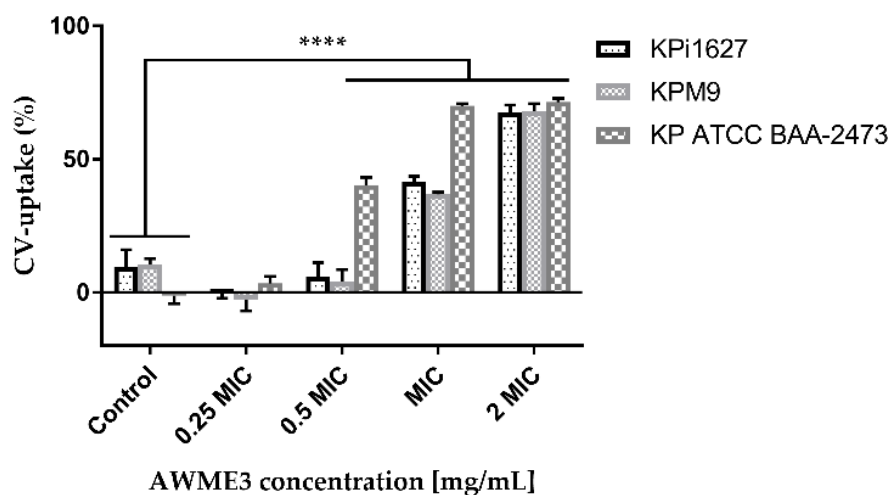


Figure 34. Modes of AWME3 action of CV uptake by *K. pneumoniae* cells membrane. Bacteria strains were treated with 0.25 MIC (0.0625 mg/mL), 0.5 MIC (0.125 mg/mL), MIC (0.250 mg/mL), and 2 MIC (0.5 mg/mL) of AWME3 concentrations for 4 h. The membrane permeability was calculated after measuring the absorbance of crystal violet dye. All data was expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis performed using tow way ANOVA variance and Dunnett's multiple comparisons test ($p < 0.05$).

K. pneumoniae ATCC BAA-2473 proved to be the most sensitive among other strains to AWME3 isolated from BSFL larvae fat, where a great significant ($p < 0.0001$) increase in the CV-uptake, when bacteria was subjected to 0.5 MIC, MIC, and 2 MIC of AWME3 for 4 h to be 40.4%, 70.05%, and 71.43%, respectively, compared to untreated bacteria (1.15%) (Figure 34). All tested MDR virulent strains exhibited high significant increase ($p < 0.0001$) for CV uptake, compared to their corresponding control groups, when they were exposed to MIC, 2 MIC of AWME3. Based on the CV uptake, membrane permeability of *K. pneumoniae* strains increased distinctly to record 6.05%, 4.13%, 40.38% against KPi1627, KPM9, KP ATCC BAA-2473, respectively, when they were treated with 0.5 MIC

(0.125 mg/mL) of AWME3. The permeabilization increased significantly to be 41.48%, 36.83%, and 70.05% against KPi1627, KPM9, KP ATCC BAA-2473, respectively, when the bacteria strains subjected to MIC (0.25 mg/mL) of AWME3 extract (Figure 34). Exposing to the highest concentration 2MIC (0.5 mg/mL) of the mixture of fatty acids prevailed in AWME3 extract, led to observed structural modifications in cell membranes of Gram-negative *K. pneumoniae* strains. This alteration increased the CV uptake significantly ($p < 0.0001$), to reach to 67.7 %, 67.9%, and 71.43% against KPi1627, KPM9, KP ATCC BAA-2473, respectively compared to their control groups (9.6%, 10.7%, 1.14%) (Figure 34). From these findings, obviously that CV uptake is a significant and specific tool, which prove the high activity of AWME3 against *K. pneumoniae* strains and distinct evidence for cell membrane permeabilisation. Our findings were in line with several studies [97,144,369,370], which used CV uptake as evidence of cell membrane disruption by antibacterial fatty acids and natural products.

6.5.3. Ethidium bromide uptake

Fatty acids from AWME3 extract altered and increased the membrane permeability of all tested *K. pneumoniae* strains, where these changes in the membrane phospholipid structure prompted CV-uptake. Crystal violet material tends to bind surface components (eg, sugars, proteins) of bacterial cells; these modest changes to permeability were further investigated and estimated using ethidium bromide as another tool measurement of membrane permeability. If an AWME3 extract permeabilises or more grossly disrupts the bacterial membrane, ethidium bromide will be able to enter the cell and bind DNA, causing an increase in fluorescence. The ethidium bromide assays constitute a better assessment of permeability caused by the AWME3 and support the CV-uptake results. Compared to control, AWME3 elicited lower emission intensity of ethidium bromide excluded from bacteria over the course of 8 h (Figure 35A, B).

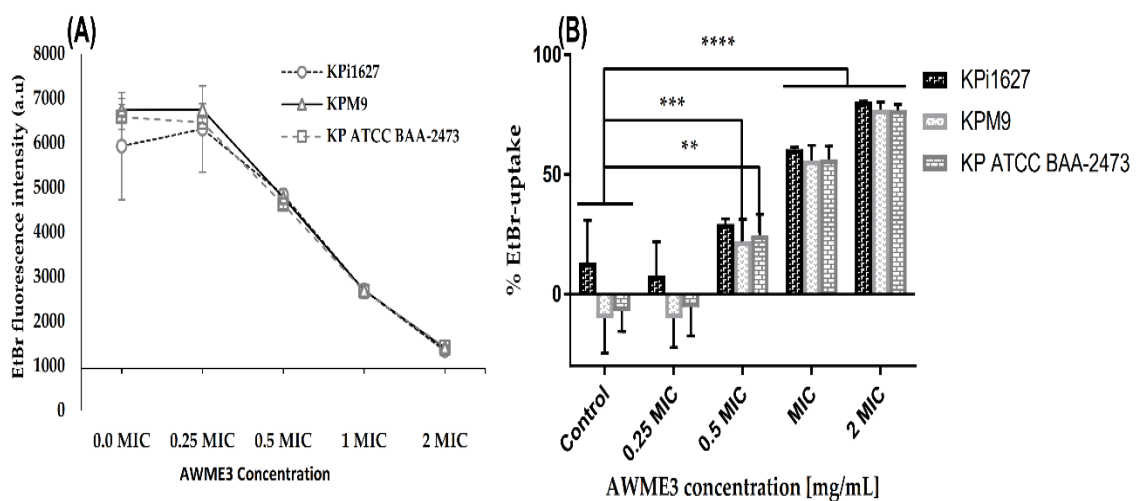


Figure 35. Ethidium bromide uptake as a measurement tool for *K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9, and *K. pneumoniae* KPATCC-BAA2473 cells membrane distabilisation by

AWME3. All strains were treated with 0.25 MIC (0.62.5 mg/mL), 0.5 MIC (0.125 mg/mL), MIC (0.25 mg/mL), and 2 MIC (0.5 mg/mL) of AWME3 for 8h. Membrane disruption was determined by measuring the absorbance of EtBr uptake in triplicate (**A**), percentage (%) of EtBr-uptake was calculated for treated bacteria based on the fluorescence intensity values of EtBr (**B**). All data are the average \pm STD of three independent experiments. A tow-way ANOVA test and Dunnett's multiple comparisons test was performed to determine the statistical significance (**p=0.001, ***p \leq 0.0009, ****p \leq 0.0001).

The amount of EtBr-uptake presented in signals decreasing based on the normalised data (Figure 35A). A great significant (p < 0.0001) increase in the EtBr uptake, when *K. pneumoniae* strains were subjected to MIC (0.25 mg/mL) and 2 MIC (0.5 mg/mL) of AWME3 (Figure 35B). EtBr uptake values for MIC and 2 MIC of AWME3 recorded as 60.56%, 80.43%, and 55.98%, 77.2%, and 56.37%, 76.88% against KPi1627, KPM9, and KP ATCC BAA-2473 strains, respectively, compared to control groups (13.29%, 10.03%, 7.12%) (Figure 35B). KP ATCC BAA-2473 strain was the most sensitive to AWME3 among other strains. The EtBr uptake increased significantly (p < 0.0009, p < 0.001) at 0.5 MIC (0.125 mg/mL) of AWME3 against KPM9 and KP ATCC BAA-2473, respectively (Figure 35B). All mentioned above results indicate that AWME3 able to penetrate and permeablise the cell membranes of all *K. pneumoniae* strains at dose dependent manner, which were proved *via* CV, and EtBr-uptake assays. Furthermore, our results were in consistent with many previous studies [97,144,371–373].

6.6. Disrupted mature biofilm visualized by light microscopy

Different microscopy techniques used to detect the biofilms disruption established by *K. pneumoniae* strains, where *K. pneumoniae* ATCC-BAA2473 was selected as a representative strain. Light, fluorescence, and scanning electron microscopy were used as direct microscopic methods to gather the evident information on treated biofilms. CV was applied to stain the biofilms formed on glass cover slips to investigate and analyse in light microscopy, the effect of AWME3 at 0.5 MBIC (0.25 mg/mL), MBIC (0.5 mg/mL), and 2 MBIC (1 mg/mL) on bacteria cells. In control group (bacteria without treatments), heavy-knit like mats of biofilms appeared under microscope, multiple layers of intact biofilm were formed on unflatten shape, furthermore several dark zones of clustered cells were appeared. Large entangled mesh due to the presence of EPS, which form the matrix of connected threads that can protect the biofilm from any hazard conditions (Figure 36A).

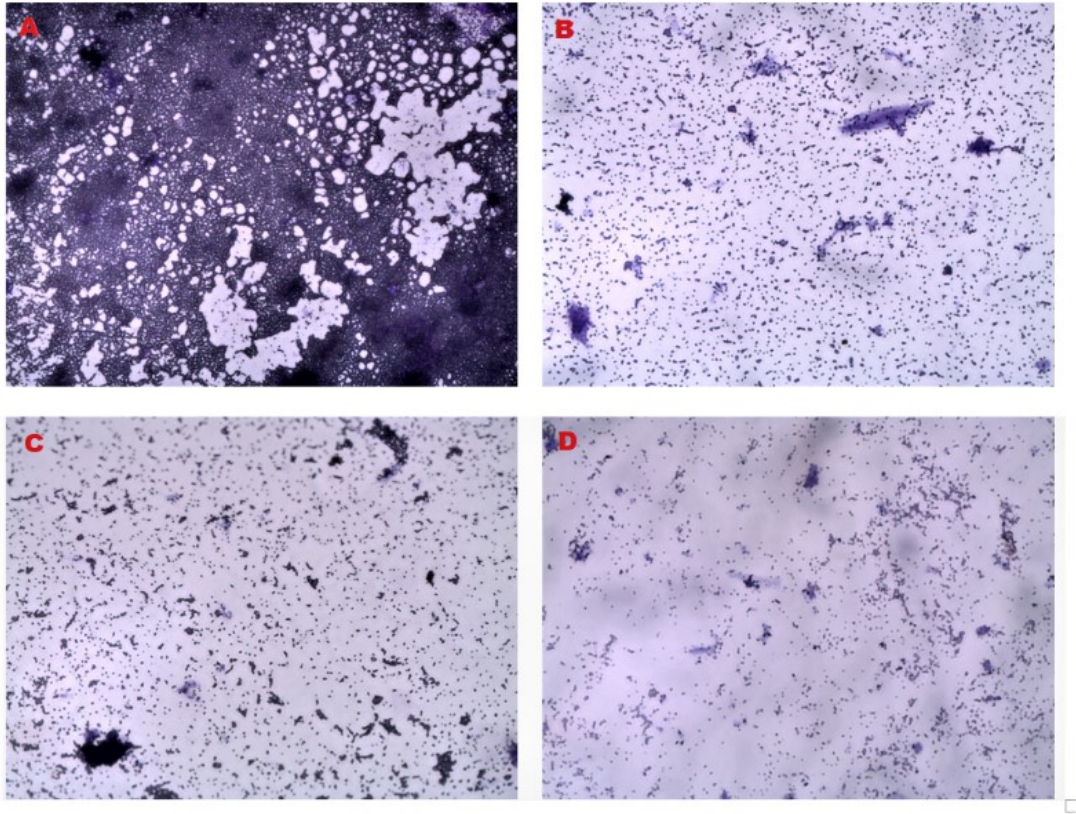


Figure 36. Disrupted matured biofilms on *K. pneumoniae* KP ATCC BAA-2473 strain formed by AWME3 on glass surfaces investigated by light microscopy (40x magnification). (A) Growth control without treatment; (B, C, D) Treated bacteria with AWME3 at concentrations 0.5 MIC (0.25 mg/mL), MIC (0.5 mg/mL), and 2 MIC (1 mg/mL), respectively.

Exposure to the sub-MIC (0.25 mg/mL) of AWME3 led to reduce the number of cells, low mats, degradation of clusters, and minimal aggregation of cells was obvious (Figure 36B). The MBIC of AWME3 (0.5 mg/mL) exhibited good antibiofilm activity as there was reduced aggregation of cells when compared to the control and lower concentrations of AWME3 (Figure 36C). At the highest concentration 2 MBIC (1.0 mg/mL) AWME3 effectively inhibited the mature biofilm formation in *K. pneumoniae* KP ATCC BAA-2473, which was evident by the complete absence of clusters or aggregated cells. In addition, many spaces were present and the bacterial cells appeared as minimal cells (Figure 36D).

6.7. Fluorescence microscopy by propidium iodide

The potential of AWME3 against bacterial biofilm described above was additionally confirmed by propidium iodide (PI) staining using fluorescence microscopy (Figure 37) detected in two different wavelengths (543/617 nm excitation/emission filter for red colour).

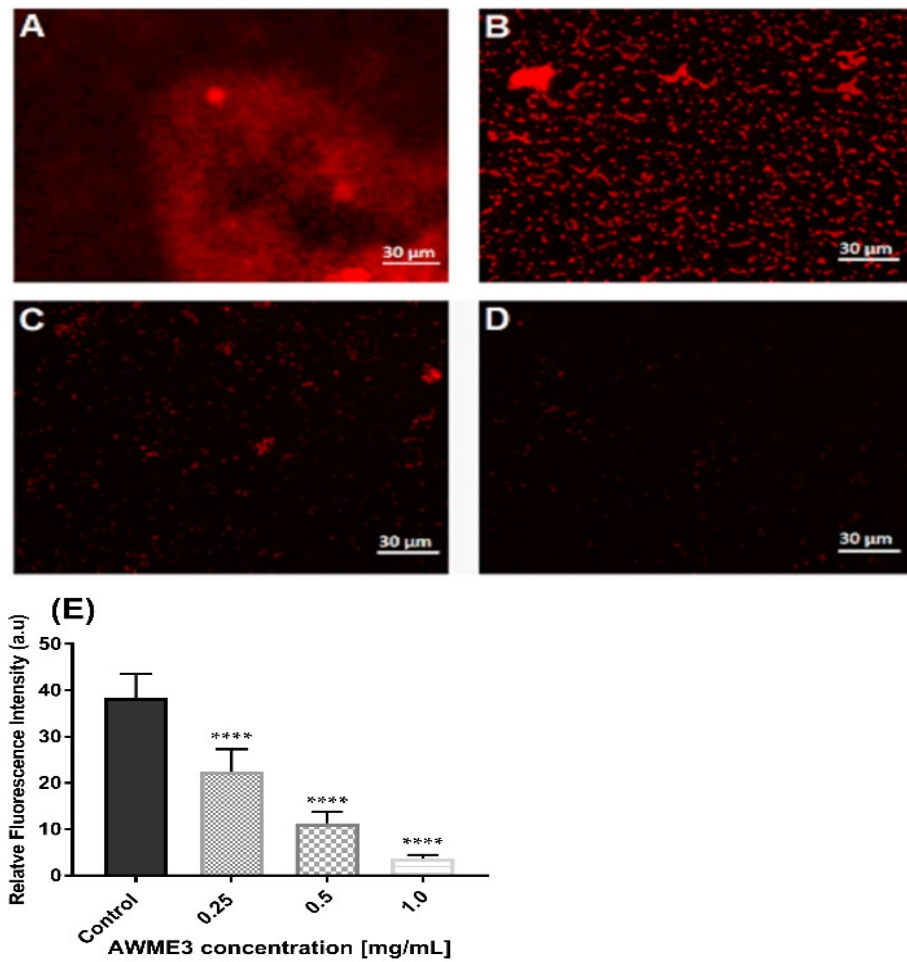


Figure 37. Fluorescence microscopy images of (A) untreated cells (control) biofilm established by KP ATCC-BAA2473 strain treated with (B) 0.5 MBIC (0.25 mg/mL), (C) MBIC (0.5 mg/mL), and (D) 2 MBIC (1.0 mg/mL) of AWME3. PI staining used to stain the biofilm with or without treatment performed on cover slides. Relative fluorescence intensity of biofilm architecture in the KP ATCC-BAA2473 strain (E) is reported in arbitrary unit (a.u) and analysed using Fiji Image J. Data are expressed as the mean \pm SDs. **** $p < 0.0001$ was significant compared to the control group and all images were visualized at 40x magnification.

As shown in control images, tested bacteria strain formed very dense biofilms staining on glass coverslips. Dense clumps of cells in biofilms were visualized and bacteria were seen to be heavily colonized and adherent in multiple layers. Exposing to different concentrations of AWME3 led to a great significant reduction in the PI intensity ($p < 0.0001$) and bacterial cells were found in scattered form (Figure 37B, C, D, E). Low mats, threads, and clumps were detected when bacterial biofilms were treated with 0.5 MBIC (0.25 mg/mL), further treated cells were found scattered and many spaces were obvious between cells (Figure 37B). High concentration at MBIC (0.5 mg/mL) of AWME3 significantly reduced cell numbers, intensity and minimal bacterial cells were obvious (Figure 37C). The 2 MBIC (1.0 mg/mL) concentration has the highest significant effect ($p < 0.0001$) on *K. pneumoniae* KP ATCC-BAA2473 strain, only a few bacterial cells adhered to the cover slides in a dispersed pattern, and the lowest fluorescence intensity was obvious compared to control group as shown in Figure 37E. These results

further demonstrated that AWME3 of BSFL fat inhibited the formation of bacterial biofilms at dose dependent manner.

6.8. Disrupted biofilm visualized by SEM

SEM was applied for the visualization of the biofilm disruption after AWME3 treatment. In untreated biofilms established by *K. pneumoniae*, KP ATCC BAA-2473 cells appeared to be aggregated and accumulated in multiple layers (Figure 38A, B, C). Furthermore, no morphological alterations were detected in untreated cells, where cells were smooth with intact cell wall, and bacilli (Figure 38C).

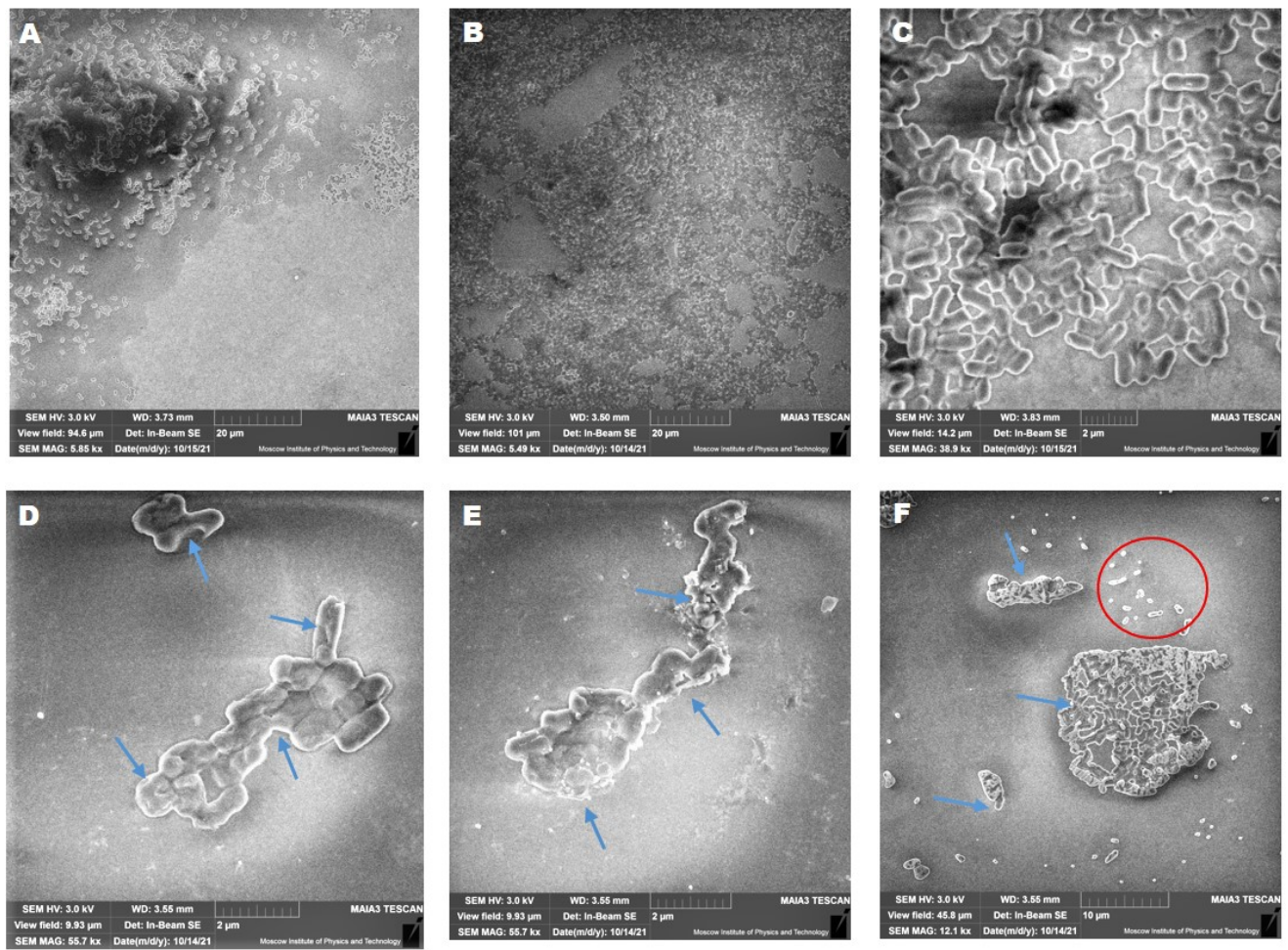


Figure 38. SEM micrographs of *K. pneumoniae* ATCC-BAA2473 biofilms developed on the glass slide surface incubated for 30 h incubation at 37 °C. Untreated biofilm at different magnification (5.49-55.7 Kx) (A, B, C), treated biofilms with 0.5 MBIC (0.25 mg/mL) (D), MBIC (0.5 mg/mL) (E), and 2 MBIC (1.0 mg/mL) (F) of AWME3.

There was a significant decrease in the number of adherent bacteria in the AWME3 treated biofilm compared to control cells. An obvious disruption of biofilm was observed, when exposed to different concentrations of AWME3 (Figure 38D, E, F). SEM analysis showed also morphological changes amongst the bacterial cells in the AWME3 treated culture, whereas cells were rough with wrinkled cell

wall, pores and damaged in multiple location as referred by blue arrows (Figure 38D, E, F). Lysed cells, cell wall debris, and ghost cells were obvious when biofilms were treated with 2 MBIC (1.0 mg/mL) of AWME3 (see blue arrows and red cycle in Figure 38F. The most pronounced effect could be observed in the tested KP ATCC-BAA2473 strain, where the biofilm was reduced down to a monolayer of adherent cells and even single cells were detected (Figure 38D, E, F). These findings suggest that AWME3 is a potential antibiofilm agent, which distort the mature biofilms and prevents further disease progression of these MDR bacteria, which causing the respiratory infections. Altogether, all microscopy techniques demonstrated that AWME3 extract isolated sequentially from BSFL fat inhibited and disrupted significantly the biofilm constructed by *K. pneumoniae* strains. These results are in line with other studies that demonstrated the ability of fatty acids and their glycerides to inhibit and eradicate single or mixed biofilms established by different microbial species via cell wall/cell membrane leakage, further impairment electron transport chain, blocking enzymes, and nutrients uptake deficiency [97,144,362,365,374]. Additionally, these mechanisms of the antivirulence and antibiofilm effects of different FAs from a wide range of biological sources such as algae, animals, and plants as the next generation of antibacterial agents have been reviewed elsewhere [96,375]. This will pave the way for AWME3 extract as a promising antibacterial and antibiofilm agent candidate beneficial in treatment of MDR nosocomial bacterial infections and oral bacteria able to form biofilms.

Chapter 7. Potential mechanism of AWME3 action against MDR human pathogenic bacteria

7.1. Antimicrobial susceptibility patterns and MDR assessment of human pathogenic bacteria

Disk assay was used to determine the antibacterial susceptibility panels of ten antibiotics against Gram-negative *A. baumannii* ATCC 19606 and Gram-positive *S. aureus* ATCC 55804 strains at 12 h and 24 h of incubation time. IZD values were interpreted according to CLSI, 2018 guidelines breakpoints for *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804. All tested bacteria strains were MDR owing to the resistance caused against two or more than antibiotics of total ten used. *A. baumannii* ATCC 19606 showed the highest resistance of 50% against ten used antibiotics, while *S. aureus* ATCC 55804 was resistant to three (30%) of ten antibacterial agents (Table 22, Figure S8). *A. baumannii* ATCC 19606 showed 100% resistance towards penicillin (P) and vancomycin (VA), where no inhibition zones were recorded around the antimicrobial disks. The most interesting that both bacteria strains were colistin and vancomycin-resistant at 12 h and 24 h of incubation time. *S. aureus* ATCC 55804 showed high susceptibility to rifampicin (RD) and penicillin (P), while *A. baumannii* ATCC 19606 was completely resistant to these antibiotics. *A. baumannii* ATCC 19606 demonstrated high susceptibility to kanamycin (K), but *S. aureus* ATCC 55804 was resistant against the same drug at 12 h and 24 h. These results demonstrated that *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 were multi-drug resistant (MDR) bacteria [236]. Our findings were in line with other studies [376,377].

Table 22. Antibiotic susceptibility of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strains

Antibiotic	Potency	IZD (mm)						
		<i>S. aureus</i> ATCC 55804		<i>A. baumannii</i> ATCC 19606		Breakpoint (mm)		
		12 h	24 h	12 h	24 h	R	I	S
G	10 µg	16.9±0.68 (S)	16.47±0.47 (S)	17.88±0.92 (S)	17.68±0.78 (S)	≤12	13-14	≥15
Ch	30 µg	25.87±0.56 (S)	24.52±0.44 (S)	22.25±0.76 (S)	22.17±0.54 (S)	≤12	13-17	≥18
K	30 µg	15.48±0.45 (I)	13.48±0.41 (R)	28.23±0.94 (S)	27.97±0.71 (S)	≤13	14-17	≥18
DOX	30 µg	21.55±0.46 (S)	21.37±0.43 (S)	18.37±1 (S)	18.28±0.6 (S)	<12	13-15	≥16
P/S	10 U- 10µg	15.75±0.5 (S)	14.45±0.46 (S)	15.6±0.34 (S)	14.35±0.25 (S)	≤11	12-14	14-22
CT	10 µg	0 (R)	0 (R)	9.58±0.56 (R)	9.72±0.57 (R)	≤10	-	≥11
RD	5 µg	36.18±0.83 (S)	35.45±0.78 (S)	13.62±0.58 (R)	12.77±0.46 (R)	≤16	17-19	≥20
E	15 µg	17.5±0.45 (I)	15.32±0.87 (I)	13.42±0.42 (R)	12.52±0.41 (R)	≤13	14-22	≥23

VA	30 µg	14.37±0.43 (R)	13.48±0.87 (R)	0 (R)	0 (R)	-	-	≥15
P	2 U	34.75±0.99 (S)	34.25±0.82 (S)	0 (R)	0 (R)	≤28	-	≥29

Abbreviations: G, gentamicin; Ch, chloramphenicol; K, kanamycin; Dox, doxycycline; P/S, penicillin-streptomycin; CT, colistin; RD, rifampicin; E, erythromycin; VA, vancomycin; P, penicillin; R, resistant; I, intermediate; S, susceptible; (0), means no inhibition zone around the disc on the plate; (-), not determined

7.2. Antibacterial activity of AWME3 against MDR *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strains

Inhibition zone diameters used to validate the antimicrobial susceptibility of AWME3 extracted from the same biomass of BSFL fat against MDR bacteria strains based on disk assay method. AWME3 extract activity was evaluated for the first time against standard MDR bacteria of *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 during 12 h and 24 h of incubation time. Bacterial cultures at optical density 10^8 CFU/mL subjected to various concentrations 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL of the larval extract AWME3, after incubation the inhibition zone (IZ) sizes were determined by measuring the inhibition zone induced around the disc by AWME3, and measurements recorded at 12 h and 24 h of incubation time (Table 23, Figure 39).

Table 23. Inhibition zone diameters caused by AWME3 of *H. illucens* larvae fat against human pathogenic strains of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606

Concentration (mg/mL)	<i>S. aureus</i> ATCC 55804		<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	
	12 h	24 h	12 h	24 h
20	19.63±0.79	18.43 ±0.35	19.55±0.34	18.1±0.35
10	16.58±0.51	15.48±0.48	16.9±0.61	14.9±0.61
5	12.68±0.46	11.38±0.39	11.8±0.22	9.7±0.34
2.5	9.83±0.29	8.62±0.43	9.07±0.6	8.55±0.41
1.25	8.66±0.42	7.55±0.34	7.43±0.42	6.87±0.37
Positive control (p/s)	15.75±0.5	14.45±0.46	15.6±0.34	14.35±0.25
Negative control (N.ct)	ND	ND	ND	ND

ND: Not determined N. CT: Negative control P/S: Positive control (Penicillin-streptomycin) with concentration (200 U/mL-200 µg/mL).

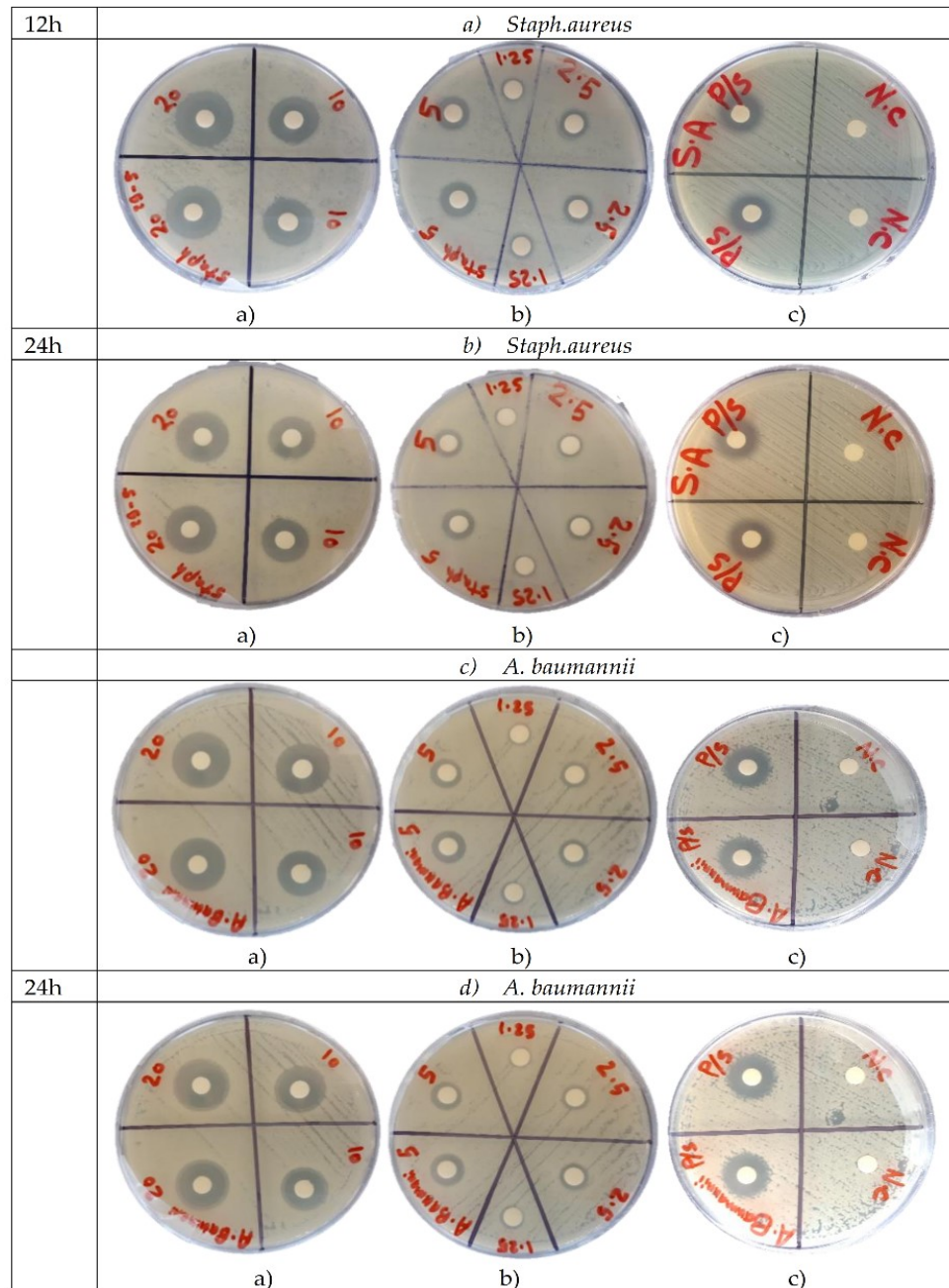


Figure 39. The inhibition zone assay for human bacteria strains. The inhibition zone diameters were measured after 12 h and 24 h of overnight incubation of the discs loaded on Petri dishes agar seeded with (a) *S. aureus* ATCC 55804, (b) *A. baumannii* ATCC 19606 strains with suspension (1×10^8 CFU/mL), (a) The discs were loaded with 50 μ L of AWME3 with concentrations 10 and 20 mg/mL; (b) loaded with 1.25, 2.5 and 5 mg/mL; (c) 50 μ L of (P/S) with concentration 200 U/mL-200 μ g/mL was used as positive control and 50 μ L of pure AWM extracting solution was used as a negative control (N.C). All samples were loaded in duplicates.

Statistical analysis conducted by two-way ANOVA used to analyse our results comparison with the positive control (P/S). Results showed that a great significant difference occurred between the mean IZ sizes obtained by treating the human pathogenic bacteria strains with the AWME3 when compared to the IZ sizes caused by the positive control (P/S) ($p \leq 0.05$). The highest inhibition zone sizes caused

by AWME3 were 18.43 ± 0.35 mm and 18.1 ± 0.35 against *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606, respectively, when treated with 20 mg/mL at 24 h of incubation, compared to the positive control (P/S), which recorded 14.45 ± 0.46 , and 14.35 ± 0.25 mm, respectively. ANOVA results showed a great significant ($****p < 0.0001$) IZD was recorded against *S. aureus* ATCC 55804, and *A. baumannii* ATCC 19606 when they subjected to a concentration of 20 mg/mL of AWME3 extract, respectively compared to the reference control at 12 h, and 24 h of incubation time (Figure 39). Of note, bacterial resistance increased by the time for all tested strains proved by the decreased IZD value when bacteria strains were incubated for 24 h (Figures 39, 40). Our results show that AWME3 has high potency against MDR bacteria, including *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strains, when they were treated with 10 and 20 mg/mL of AWME3. All MDR strains of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 were inhibited at dose-dependent manner; moreover, all tested bacteria strains were eradicated and killed at 20 mg/mL concentration of AWME3. The activity of AWME3 isolated from BSFL fat was more effective than the activity of HI larvae oil [320].

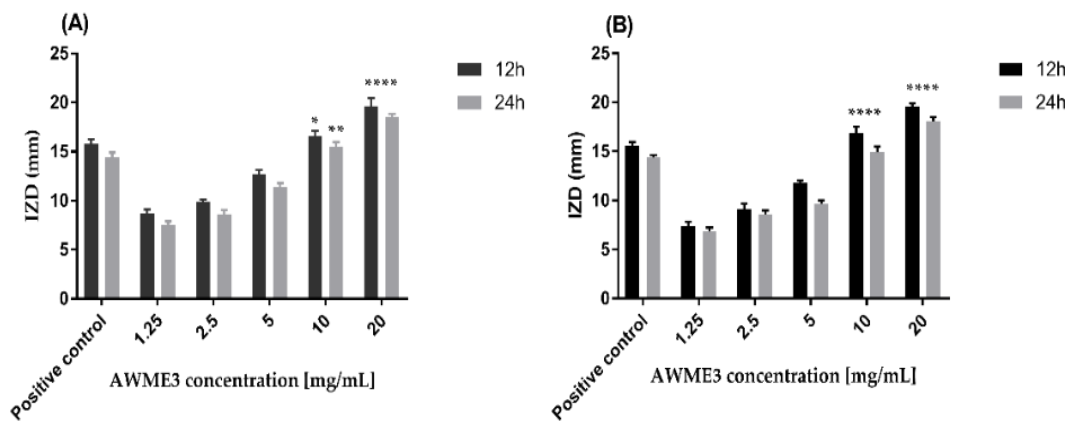


Figure 40. Antimicrobial sensitivity of AWME3 against (A) *S. aureus* ATCC 55804, (B) *A. baumannii* ATCC 19606 strains. The bacteria strains were subjected to concentrations of 1.25, 2.5, 5, 10, and 20 mg/mL of AWME3. The IZD value were measured after 12 h and 24 h of incubation at 37 °C by measuring the clear zone diameters surrounding of the disks (in mm). Penicillin - streptomycin (P/S) used as a positive antibacterial control. All values are represented as mean \pm SD, in triplicate ($n = 3$). Data were analysed by two-way ANOVA, followed by Dunnett's Multiple Comparisons Test. Data represented as significant difference as compared to positive control and p-values were (* $p=0.013$ - $****p < 0.0001$).

7.3. Bactericidal AWME3 activity against MDR human pathogenic bacteria strains

Microdilution assay used to determine the MICs of all tested bacteria strains. As demonstrated in Table 24 the MICs of the AWME3 extract determined against tested bacteria and all data recorded after 24 h of incubation.

Table 24. Evaluation of the bactericidal and bacteriostatic activity of the AWME3

Antimicrobial agent	<i>S. aureus</i> ATCC 55804			<i>A. baumannii</i> ATCC 19606		
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC /MIC	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC /MIC
AWME3	190	380	2	380	380	1.0
Penicillin – streptomycin (P/S)	19.53	19.53	1	9.77	19.53	2.0

The bacterial cultural growth of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 were inhibited by AWME3 of *H. illucens* larvae fat with 190 $\mu\text{g/mL}$ and 380 $\mu\text{g/mL}$, respectively of MIC. Growth inhibition was observed by penicillin-streptomycin at 9.77 $\mu\text{g/mL}$ of MIC for *A. baumannii* ATCC 19606, while *S. aureus* ATCC 55804 strain was inhibited at 19.53 $\mu\text{g/mL}$. All tested strains were treated with different concentrations of the positive control in the range 0.6-78.125 $\mu\text{g/mL}$. MBC was identified as the lowest concentration, which can kill 99.99% of the tested bacteria strains after 48 h of incubation time. The same 380 $\mu\text{g/mL}$ of MBC was determined for *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strain, likewise the MBC of positive control was recorded at 19.53 $\mu\text{g/mL}$ against both *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strain. These results demonstrate that AWME3 has high activity against MDR bacteria strains. Bactericidal activity was determined based on the ratio of MBC/MIC. The ratio of MBC/MIC of AWME3 recorded two and one against *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strain, respectively, when they were treated with various concentrations of AWME3 (0.38-3.0 mg/mL). On the other hand, the ratio of MBC/MIC value recorded 1.0 and 2.0 of the positive control (P/S) against *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strain, respectively (Table 24), when both bacteria strains subjected to different concentrations with range (0.6-78.125 $\mu\text{g/mL}$) of the reference antibiotic (P/S). Based on these results, AWME3 extract from BSFL fat acted as bactericidal on Gram-positive bacteria (*S. aureus* ATCC 55804) and Gram-negative bacteria (*A. baumannii* ATCC 19606).

7.4. Effect of AWME3 on bacterial growth curves

Growth kinetics at OD₆₀₀ used to study the growth curves for *S. aureus* ATCC 55804 as Gram-positive and *A. baumannii* ATCC 19606 as Gram-negative bacteria. The growth curves of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 treated with different concentrations of the AWME3 extract of BSFL fat shown in Figure 41.

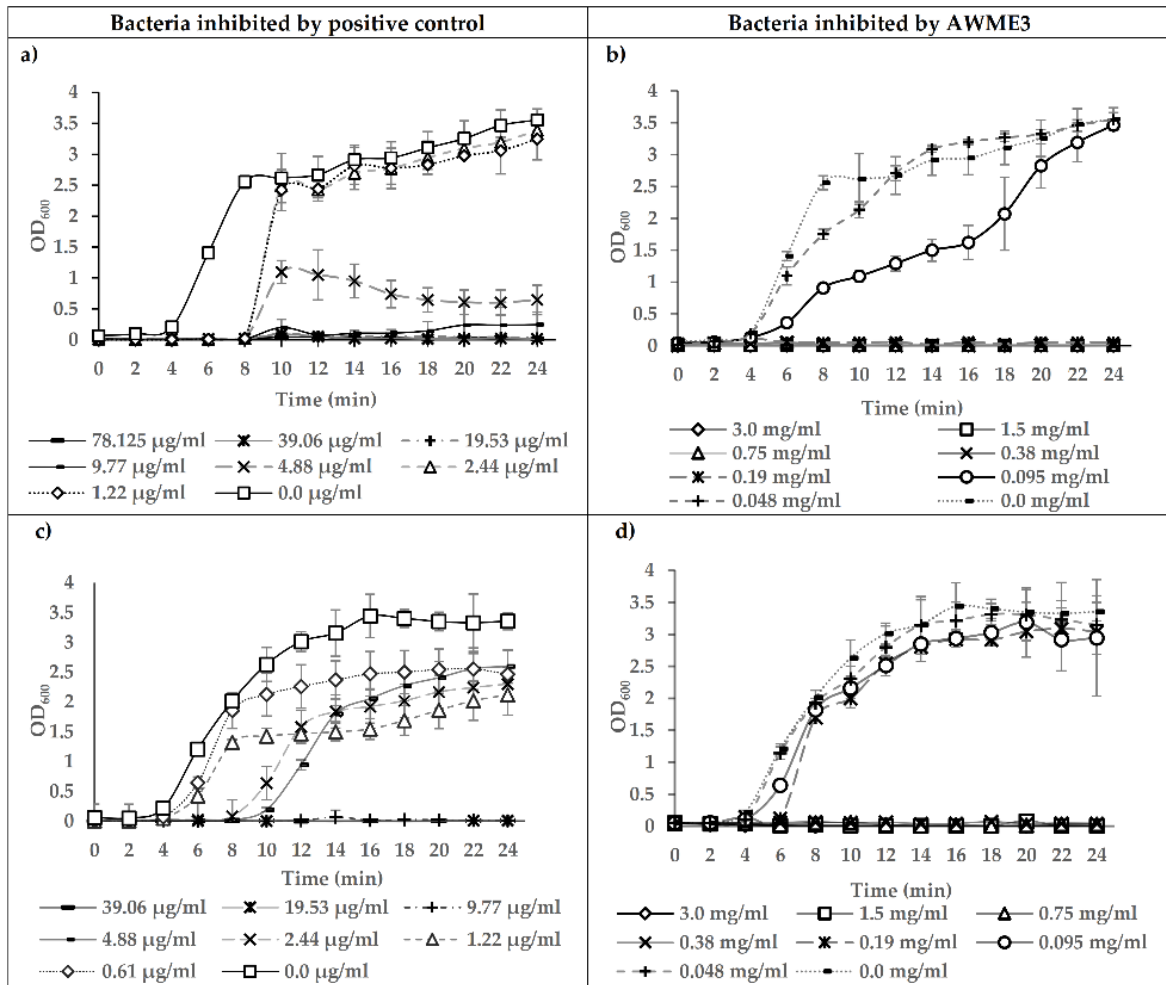


Figure 41. The growth curves of (a, b) *S. aureus* ATCC 55804 and (c, d) *A. baumannii* ATCC 19606 treated with different concentrations of either AWME3, or P/S. Each data point is the average of three independent assays \pm Standard deviation of the mean (SD) and * $p < 0.05$ was significant.

In the presence of 0.048 and 0.095 mg/mL of AWME3 extract, the growth curves of *S. aureus* ATCC 55804 included three phases: lag, exponential and stationary phases. Since the bacterial culture density, including live and dead cells, was assessed by OD₆₀₀, the decline phase could not be detected on the growth curves of *S. aureus* ATCC 55804 strain. The MBC values of extract induced the inhibition of growth, which appeared as straight line, parallel to the negative control. Untreated *S. aureus* ATCC 55804 reached the exponential growth phase rapidly, after about 4 h. The concentration 0.048 mg/mL of AWME3 reduced the period time of the log phase of *S. aureus* ATCC 55804 cells to begin at 4 h and stop at 16 h, compared to the untreated cells, which their log phase lasted to 22 h (Figure 41). When *S. aureus* ATCC 55804 cells exposed to 0.095 mg/mL of AWME3, the log phase lasted 24 h before the stationary phase began compared to the untreated *S. aureus* ATCC 55804 cells, which their stationary phase began early at 22 h. In addition, the log phase of treated bacterial cells of *S. aureus* ATCC 55804 recorded OD₆₀₀=1.62 \pm 0.27 unit at 16 h, compared to the negative control of *S. aureus* ATCC 55804, which recorded 2.94 \pm 0.26 unit at the same incubation time. The concentration 0.38 mg/mL of AWME3 was

previously determined as bactericidal and the bacterial growth phases were not detected on the growth curve when this concentration was used. Positive control (P/S) delayed the log phase of *S. aureus* ATCC 55804 when it was treated with different concentrations (1.22-9.77 $\mu\text{g/mL}$), since the log phase began at 8 h compared to the untreated bacteria which started early at 4 h. The most interesting that the concentration 4.88 $\mu\text{g/mL}$ of the reference antibiotic stopped the log phase of *S. aureus* ATCC 55804 cells at 10 h and increased the decline phase to continue from at 10 h to 24 h. In addition, the concentration 9.77 $\mu\text{g/mL}$ of P/S decreased the period time of the log phase to be 2 h and increased the stationary phase time to begin at 8 h, and continue until 24 h.

The concentration 0.19 mg/mL of the AWME3 has significant influence on the growth curve of *A. baumannii* ATCC 19606 cells, where the exponential phase was delayed to start at 6 h with $\text{OD}_{600}=0.1\pm 0.021$ compared to the untreated cells of *A. baumannii* ATCC 19606, which recorded $\text{OD}_{600}=1.21\pm 0.08$ unit. The concentration 0.095 mg/mL of AWME3 stopped the log phase at 18 h and exceeded the decline phase to begin early at 18 h compared to the negative control of *A. baumannii* ATCC 19606 cells, where the decline phase was undetectable until 24 h. All concentrations at 3.0, 1.5, 0.75, and 0.38 mg/mL of AWME3 inhibited and eradicated the bacterial growth of *A. baumannii* ATCC 19606. The concentrations 2.44 and 4.88 $\mu\text{g/mL}$ of the positive control (P/S) delayed the log phase of *A. baumannii* ATCC 19606 to begin at 8 h compared to the untreated cells of *A. baumannii* ATCC 19606, which began at 4 h. The optical densities values ranged between 0.94 ± 0.08 and 1.42 ± 0.16 unit at 12 h compared to the untreated *A. baumannii* ATCC 19606 cells, which recorded 3.01 ± 0.17 unit at the same incubation time. From all above-mentioned results, AWME3 of BSFL fat has high significance effect on the growth curves of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 in the dose dependent manner. Herndon *et al.*[132] documented that FAs have significant effect on the growth curves of Gram-negative bacteria.

7.5. Elucidation bacterial cell viability via MIC50 assessment

Cell viability test was performed using Almar Blue (AB) assay. The data obtained from the AB assay demonstrated that 0.19, 0.38, 0.76, and 1.5 mg/mL of AWME3 have significant antimicrobial effects on planktonic forms of both *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 ($P < 0.05$ compared with the control groups). AWME3 at the 0.38, 0.76, and 1.5 mg/mL concentrations inhibited and eradicated completely the growth of planktonic *S. aureus* ATCC 55804 over 100% after exposure to these concentrations, while 0.19 mg/mL showed inhibition of *S. aureus* ATCC 55804 planktonic cells with 95.9 % compared to the untreated cells. The concentrations 0.38, 0.76, and 1.5 mg/mL showed significant eradication for *A. baumannii* ATCC 19606 planktonic cells ($P < 0.05$). With regard to planktonic *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 with inhibition rate (95.9-100%) showing a tendency of AWME3 dose dependent manner (Figure 42).

Our results highlighted that the concentration of AWME3 inhibited 50% of *S. aureus* ATCC 55804 (MIC₅₀) was 147 µg/mL, when bacterial cells were subjected to various concentrations in the range 0.012-1.5 mg/mL of AWME3 concentrations. *A. baumannii* ATCC 19606 was more resistant to AWME3 treatment than *S. aureus* ATCC 55804 showing 50% of planktonic *A. baumannii* ATCC 19606 cells inhibition at 222 µg/mL of AWME3. The MIC₅₀ values of the positive control (P/S) recorded 9.1 and 6.07 µg/mL against *S. aureus*, ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606, respectively, after exposure to different concentrations (0.6-78.125 µg/mL) of P/S at 24 h (Figure 42). We concluded from these findings that Gram-negative *A. baumannii* ATCC 19606 was the more resistant than Gram-positive *S. aureus* ATCC 55804 to AWME3. Our study indicated that the AWME3 extract of the *H. illucens* larvae fat exhibits high activity against MDR nosocomial bacteria strains. Taken together, the antimicrobial properties of AWME3 including MIC, MBC, and MIC₅₀ have significant inhibition and eradication of both Gram-negative and Gram-positive bacteria, compared to the data of other literature [242,378–380].

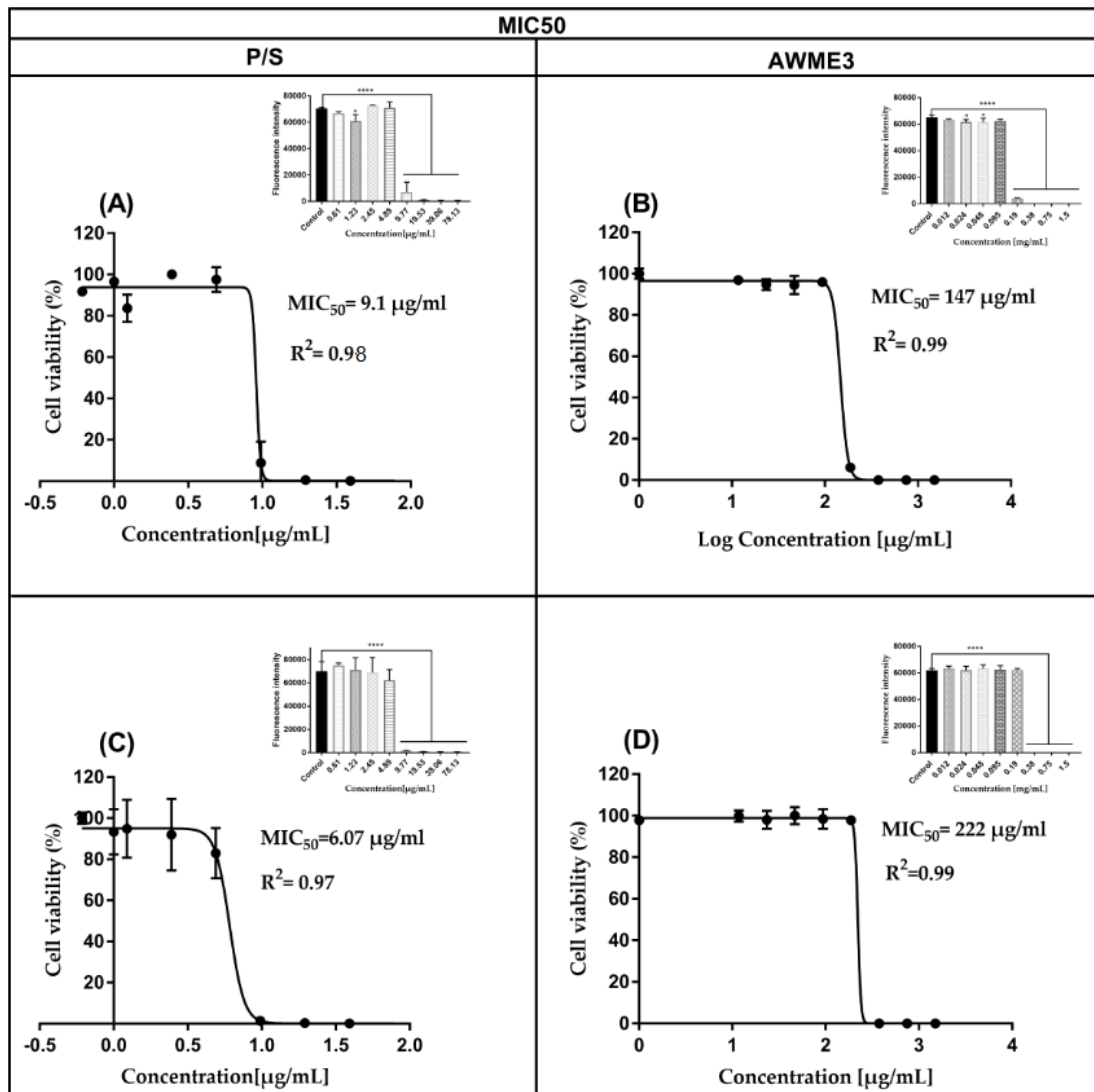
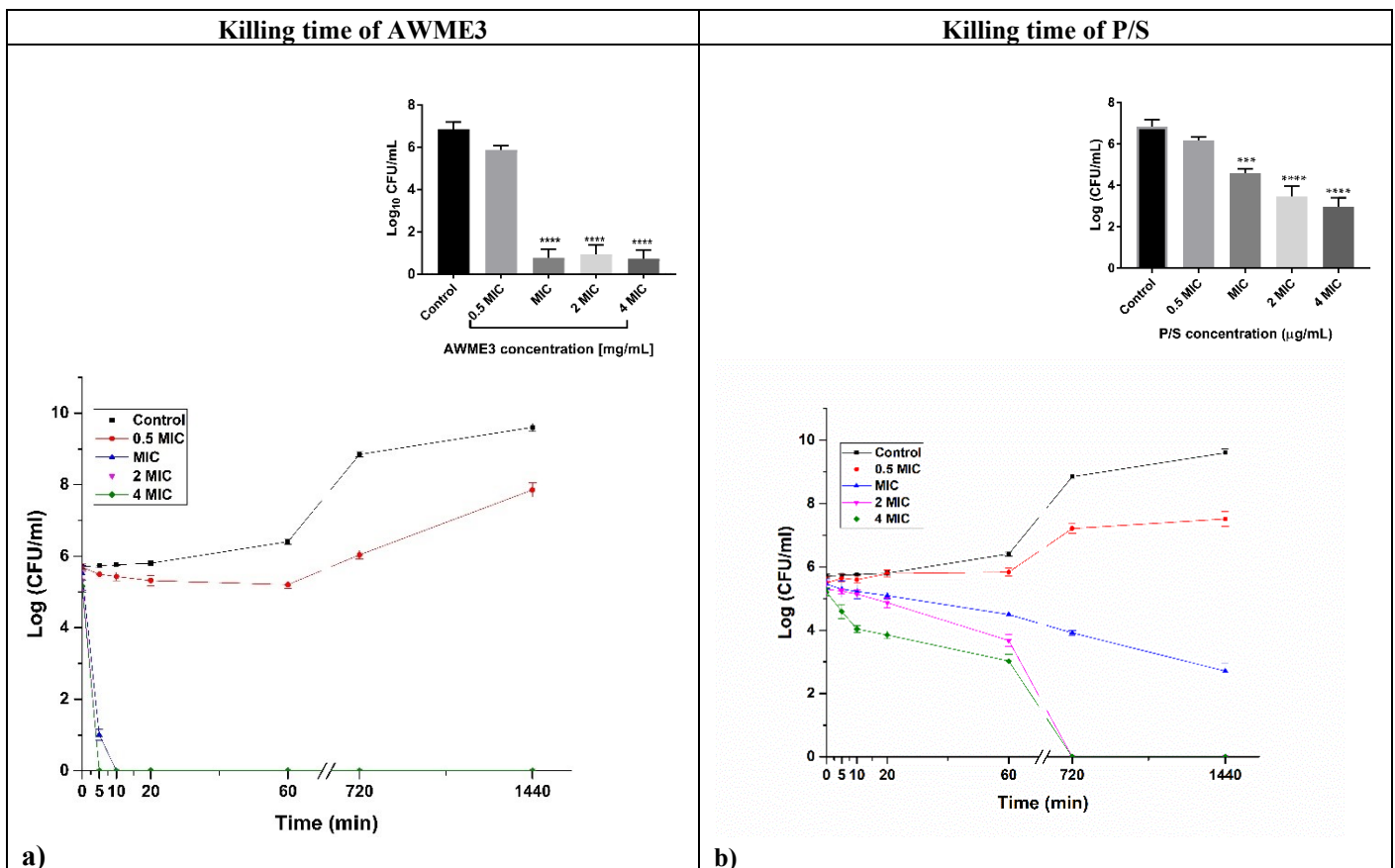


Figure 42. Effect of AWME3 from HI larvae fat on human pathogenic *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 cells viability. Cell viability (%) was determined using the Almar blue method. Error bars indicate

the standard deviation of % viability obtained from three separated experiments, one-way ordinary ANOVA Dunnett's multiple comparisons test (**** $p < 0.0001$) was significant. The MIC50 values were calculated based on the reduction of Almar blue assay and compared to the positive control (P/S). The pathogenic cells viability was assessed after 24 h of incubation. (A, C) treatment with P/S; (B, D) treatment with AWME3; (A, B) *S. aureus* ATCC 55804 strain; (C, D) *A. baumannii* ATCC 19606 strain. The MIC50 values were calculated using the non-linear regression mode of Graph pad Prism 7 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The MIC50 values are the average of three independent experiments \pm standard deviation error mean (SEM).

7.6. Time kill curves study

After confirming the excellent antimicrobial activity of AWME3 against multidrug resistant *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 the time-kill assays were performed in order to elucidate the rate and extent of antibacterial activity and distinguish bacteriostatic from bactericidal activity (Figure 43).



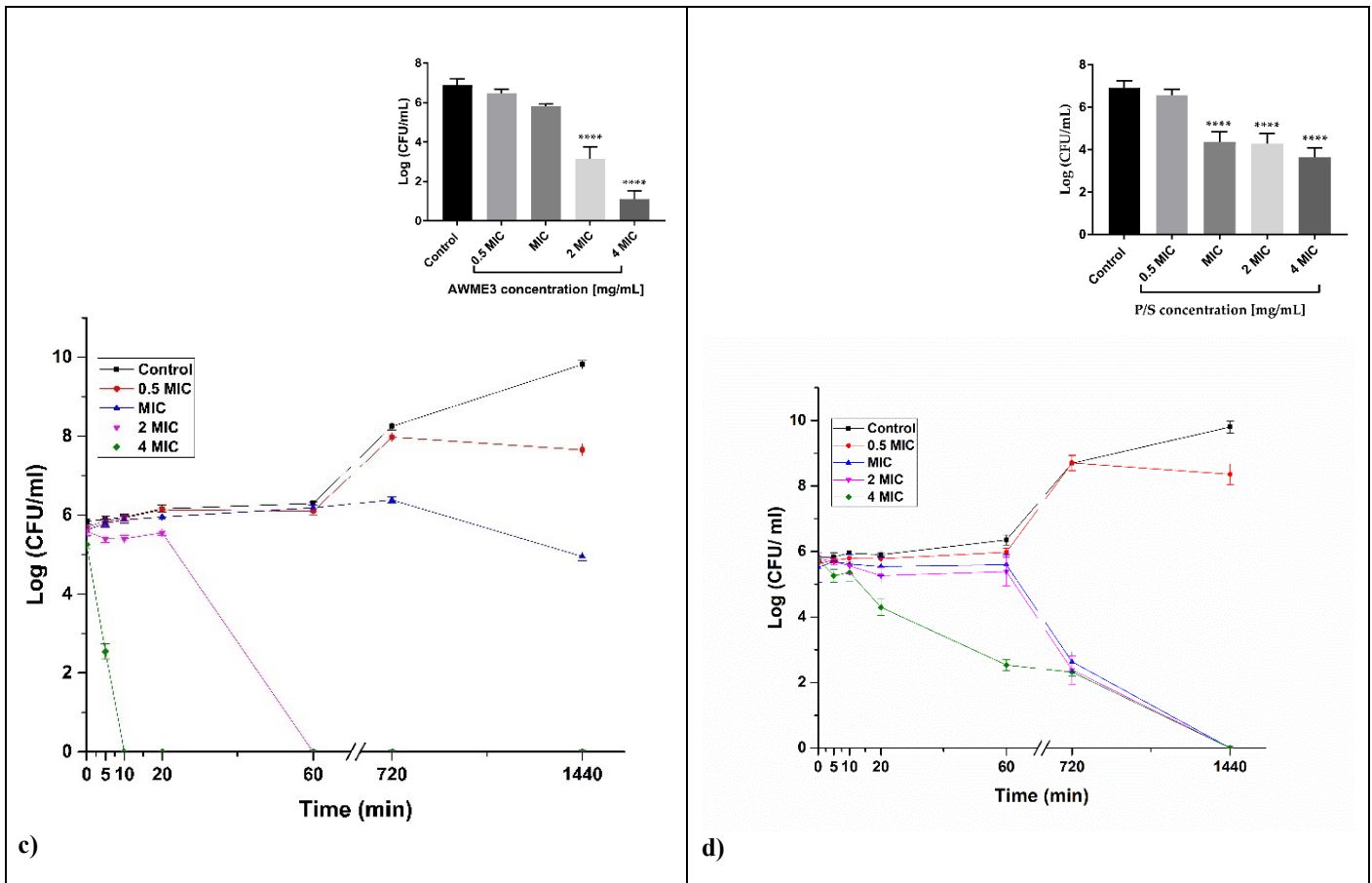


Figure 43. Time-kill curves of AWME3 isolated from HI larvae fat performed in LB broth at 0.5 MIC, MIC, 2 MIC, and 4 MIC levels of AWME3 against (a) *A. baumannii* ATCC 19606, (c) *S. aureus* ATCC 55804, Penicillin-streptomycin (P/S) (b), against the *A. baumannii* ATCC 19606 and (d) against *S. aureus* ATCC 55804. Overnight cultures of *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 adjusted to $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL, incubated at 37 °C. Viability was assessed by determining CFU/mL at incubation time (0, 5, 10, 20, 60 min) during the first hour after AWME3, and positive control (P/S) exposure and following 12 h, and 24 h of incubation. Statistical differences ($*p < 0.05$) between CFU recovered from treated and untreated cultures are shown (non-parametric one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test). The results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments.

In controls, the bacterial counts increased by 2.41 log₁₀ CFU/mL after 12 h of incubation. The killing assay of AWME3 and the reference antibiotic (P/S) were conducted in parallel to determine their bactericidal and bacteriostatic behaviour. AWME3 showed killing of MDR *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606, in concentration-dependent manner. Thus, at 2 MIC (0.75 mg/mL), 4 MIC (1.5 mg/mL) of AWME3 showed the fast bactericidal activity capable of completely eliminating a high starting inoculum of *A. baumannii* ATCC 19606 (5.17×10^5 CFU/mL) within 5 minutes (Figure 43a). At the MIC (0.38 mg/mL) was observed a slower bactericidal activity with complete eradication of *A. baumannii* ATCC 19606 after 10 min of incubation time. On the other hand, *S. aureus* ATCC 55804 strain was eliminated after exposing to 4 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3 within 10 minutes. *S. aureus* ATCC

55804 planktonic cells was eliminated after treatment with 2 MIC (0.38 mg/mL) within 60 min. In contrast to AWME3, standard antibiotic (P/S) demonstrated slower killing log reduction after 12 h of exposure and 24 h spent to eliminate *S. aureus* ATCC 55804 cells when treated with 1, 2, and 4 MIC of AWME3. The rapid bactericidal activity of AWME3, when compared to the positive control (P/S), is mainly attributed to its ability to more rapidly permeabilise the *S. aureus* ATCC 55804, and *A. baumannii* ATCC 19606 membrane. AWME3 with fast bactericidal activity against MDR strains of *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 reducing the potential emergence of bacterial resistance, and reducing duration of treatment. The combination of SFAs, PUFAs, and their glycerides in AWME3 extract were able to kill and eradicate *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* strains in short period of time (5-10 min), compared to other studies [94,381,382]. The low MICs concentrations and the high bactericidal effect of AWME3 against *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 encouraged us for more deep investigation of the mechanism of AWME3 action, which could explain the high efficacy of AWME3 against broad spectrum of bacterial pathogens.

7.7. Salt tolerance effect

Salt such as sodium chloride acts as a selective agent for bacteria and changes osmotic equilibrium balance and interferes with membrane permeability. It is known that the high salt concentration inhibits different types of bacteria but allows salt-tolerant organisms to grow [383]. To examine whether the antibacterial activity of AWME3 was compromised in the presence of salts, we treated *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 with different concentrations of AWME3 under various salt concentrations. The salt tolerance potential of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 treated with AWME3 at the MIC and 2 MIC concentrations was shown in Figure 44. The proportion (%) of cells that were able to form colonies in NA-NaCl plates compared to NA plates (salt tolerance) was represented in Figure 44. When the bacteria pre-treated with AWME3 and then inoculated on nutrient agar media supplemented with NaCl 0%, 2.5%, 5% and 10% of NaCl concentrations, a significant decrease in the number of colony-forming units at 10% of NaCl and survivors colonies were 82.52% for *S. aureus* ATCC 55804, compared to the control without NaCl (**** $p < 0.0001$) (Table 25, Figure 44B). On the other hand, *A. baumannii* ATCC 19606 showed no growth on NA plates when it was treated with MIC and 2MIC of AWME3, as indicated in Figure 44A.

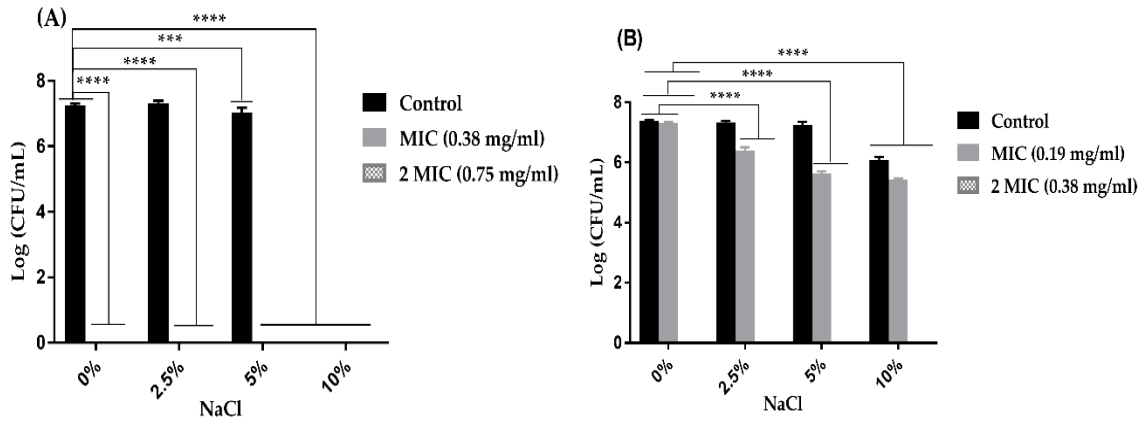


Figure 44. Effect of AWME3 extracted from *H. illucens* larvae fat at MIC and 2 MIC concentrations on the reduction of salt tolerance of *A. baumannii* ATCC 19606 (A) and *S. aureus* ATCC 55804 (B). All values are represented as mean \pm SD, in triplicate (n = 3). Data were analysed by two-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test. Data represented as significant difference as compared to the control without NaCl and $p < 0.05$ was significant.

Neither the control, nor the treated sample showed any growth of bacteria in the NA plates supplemented with 10% NaCl for both *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 treated with 2 MIC (Figure 44A, B). Pre-treated NA plates supplemented with 2.5% and 5% showed non-significant decrease in survivors colonies compared to the control without NaCl for *S. aureus* ATCC 55804 (Figure 44B). All treated plates with 0.19 mg/mL of AWME3 showed high significant variance and the number of survivors colonies were sharply decreased (**** $p < 0.0001$), except the plates of NA without NaCl and treated with MIC of AWME3 showed non-significant variance in survivors colonies compared to the untreated control without NaCl of *S. aureus* ATCC 55804 (Figure 44B, Table 26). The survivors of *A. baumannii* ATCC 19606 decreased significantly from 100 % to 0% after exposure to 10% NaCl (**** $p < 0.0001$) compared to untreated bacterial cells of *A. baumannii* ATCC 19606 after 1 h of incubation time, furthermore non survival was detected after treatment with different concentrations (MIC, 2 MIC) of AWME3. Our findings declared that bacterial cells treated with AWME3 in the presence of different concentrations of NaCl exhibited significant reduction in the survival colonies, and these results were in line with previous studies [384,385].

Table 25. Salt tolerance of *S. aureus* ATCC 55804 treated with MIC and 2 MIC of AWME3 on NA plates with 0, 2.5, 5, and 10% NaCl

Treatments	Log CFU/mL	Log CFU/mL	Log CFU/mL	Average	STD	Survivors
CT NA without NaCl	7.4	7.34	7.4	7.38	0.251661	100
NA+2.5%	7.3	7.32	7.38	7.333333	0.2	99.36766
NA+5%	7.3	7.1	7.3	7.233333	0.208167	98.01265

NA+10%	6.17	6	6.1	6.09	0.1	82.52033
NA+MIC	7.3	7.25	7.35	7.3	0.251661	98.91599
MIC+2.5%	6.3	6.5	6.41	6.403333	0.503322	86.76603
MIC+5%	5.7	5.58	5.63	5.636667	0.602771	76.3776
MIC+10	5.47	5.43	5.39	5.43	0.251661	73.57724
CT NA+2 MIC	0	0	0	0	0	0
2 MIC+2.5%	0	0	0	0	0	0
2 MIC+5%	0	0	0	0	0	0
2 MIC+10 %	0	0	0	0	0	0

Abbreviations; CT, control; NA, nutrient agar; STD, standard deviation

Table 26. Salt tolerance of *A. baumannii* ATCC 19606 treated with MIC, 2 MIC of AWME3 on NA plates with 0, 2.5, 5, and 10% NaCl

Treatments	Log CFU/mL	Log CFU/mL	Log CFU/mL	Average	SD	Survivors
CT NA without NaCl	7.26	7.17	7.3	7.24	0.066583	100
NA+2.5%	7.23	7.3	7.4	7.23	0.08544	99.86
NA+5%	7.2	6.9	7	7.03	0.152753	97.1
NA+10%	0	0	0	0	0	0
NA+MIC	0	0	0	0	0	0
MIC+2.5%	0	0	0	0	0	0
MIC+5%	0	0	0	0	0	0
MIC+10 %	0	0	0	0	0	0
CT NA+2 MIC	0	0	0	0	0	0
2 MIC+2.5%	0	0	0	0	0	0
2 MIC+5%	0	0	0	0	0	0
2 MIC+10%	0	0	0	0	0	0

Abbreviations; CT, control; NA, nutrient agar; SD, standard deviation.

7.8. Assessment of the bacterial cell membrane integrity

Based on the enhanced toxicity of AWME3, we hypothesized that the ingredient compounds of AWME3 extract are particularly effective at compromising the integrity of bacterial membrane, causing toxicity to bacterial cells. To support this hypothesis, we employed a propidium iodide (PI) staining assay. PI can only penetrate bacterial cells with compromised membrane and binds nucleic acids of the planktonic *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 cells. The PI uptake assay was performed on *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 used as representatives of Gram-negative and Gram-positive strains, respectively, and exposed to the same concentrations of AWME3 (0.19-0.75 mg/mL). AWME3 increased the number of PI-positive cells within a few

minutes and in a concentration-dependent manner (Figure 45), indicating that AWME3 has the capability to permeabilise bacterial cells at the same or even lower concentrations.

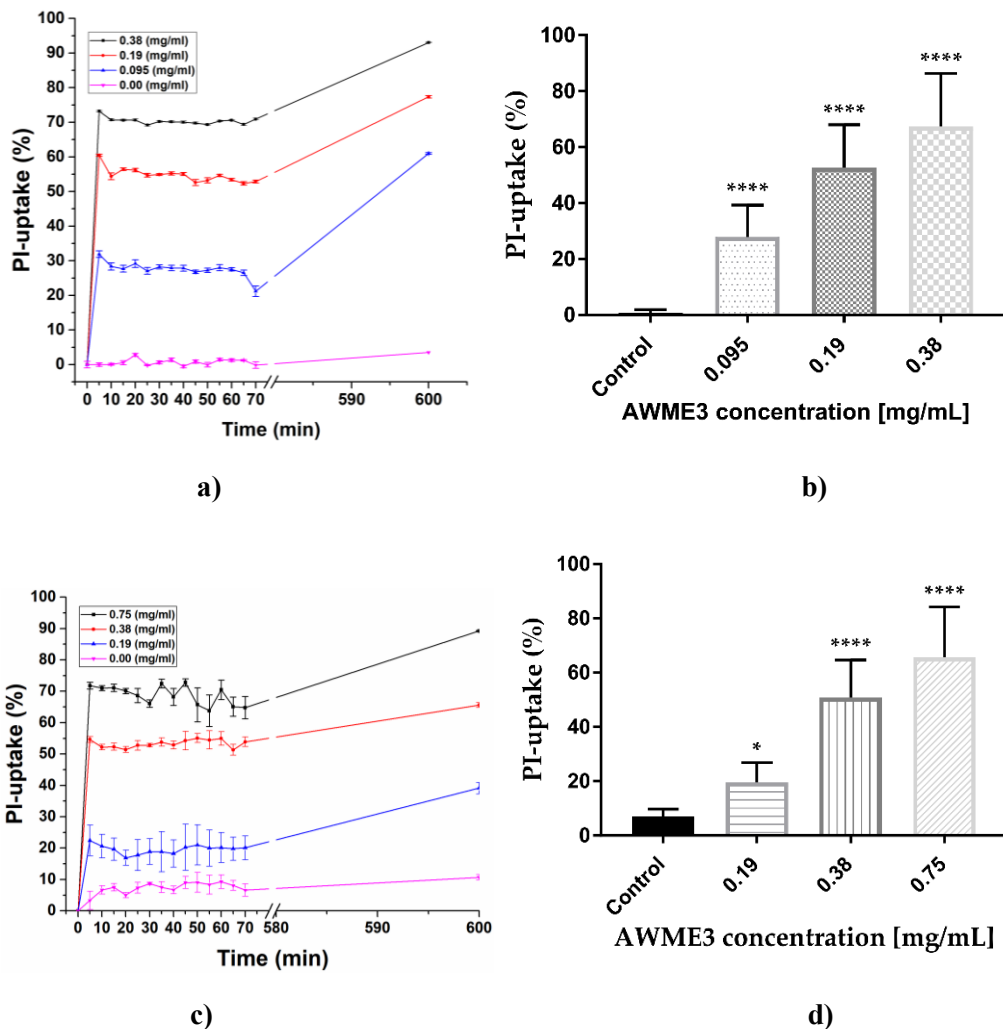


Figure 45. Membrane disruption and permeabilisation. Membrane disruption induced by AWME3 as detected by PI uptake at 0.5, 1, and 2 MIC in **(a, b)** *S. aureus* ATCC 55804 and **(c, d)** *A. baumannii* ATCC 19606. The permeabilisation assay with AWME3 has been performed in a mixture (1:1) of 20 mM glucose, and 5 mM HEPES. Bacterial cells were treated for different incubation times, with indicated concentrations of AWME3. The PI-uptake (%) was calculated based on the normalized data that are the mean \pm SD of three independent experiments, one-way ordinary ANOVA Dunnett's multiple comparisons test (* $p < 0.014$) was significant.

AWME3 permeabilised more than 60% of *S. aureus* ATCC 55804 cells after 5 min of treatment at MIC concentration (0.19 mg/mL), the permeability increased to reach to more than 70% at 2 MIC (Figure 45a, b). An even higher degree of permeabilisation was observed in *S. aureus* ATCC 55804 cells at 2 MIC to reach more than 90% after 600 min incubation. Likewise, *A. baumannii* ATCC 19606 cell membrane permeability increased by more concentration of AWME3 and the time of incubation. The 1 MIC (0.38 mg/mL) and 2 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3 permeabilised 55%, 70%, respectively within 5 min of treatment. The treatment with sub-MIC (0.095 mg/mL) of AWME3 achieved 30% of permeabilised *S. aureus* ATCC 55804 cells within 5 min, while the sub-MIC of

AWME3 (0.19 mg/mL) caused permeability with 20% of the *A. baumannii* ATCC 19606 after 5 min exposure (Figure 45c, d). All AWME3 treatments have a great significant permeabilisation ($p=0.0001$) of the cell membrane of both *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 at different time exposure. These results clearly show that the addition of the AWME3 dramatically kills and inhibits the growth of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strain and clearly suggest that cell permeabilisation has become the main mechanism of killing and this hypothesis was in agreement with the several studies [131,333].

7.9. Leakage of cellular cytoplasmic materials

Nucleic acid and protein of macromolecules in the cell have maximum absorption peaks at 260 nm and 280 nm, respectively. Another strategy for determining the antimicrobial mode of action of AWME3 against Gram-positive and Gram-negative human pathogenic bacteria was performed based on release of 260-nm absorbing materials from the *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 cells treated with AWME3. Figure 46 shows the leakage of nucleic acid and proteins of the bacteria treated with different concentrations of AWME3 (MIC, 2 MIC). The OD₂₆₀ value of the control group showed few changes during the first hour, but intracellular materials release increased to (OD₂₆₀=1) after 2h of incubation due to disrupted cells during washing, centrifugation and osmotic effect of PBS buffer (pH=7.2±0.2) on the cell membranes. On the other hand, minor changes were observed in released genetic material at 280 nm of the negative control during incubation time. After treatment, approximately more than 3 folds increase in the optical density of the bacterial cell culture filtrates treated with 2 MIC of AWME3 was observed compared to the negative control (Figure 46A, C). Similar effect was observed when *A. baumannii* ATCC 19606 cells treated with MIC (0.38 mg/mL) and 2 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3 during the same interval of incubation time (Figure 46A, B), while significant increase (**** $P<0.0001$) in released materials occurred when *S. aureus* ATCC 55804 cells exposed to MIC (0.19 mg/mL) and 2 MIC (0.38 mg/mL) of AWME3 during the first hour of incubation (Figure 46C, D). From these findings, this directly indicates the confirmation of leakage of 260 and 280-nm absorbing materials from the bacterial cells treated with MIC and 2 MIC of AWME3. Altogether cytoplasmic material leakage and cytoplasmic membrane integrity can be significant evidence for killing bacteria after AWME3 treatment, therefore several studies reported the same findings [95,133].

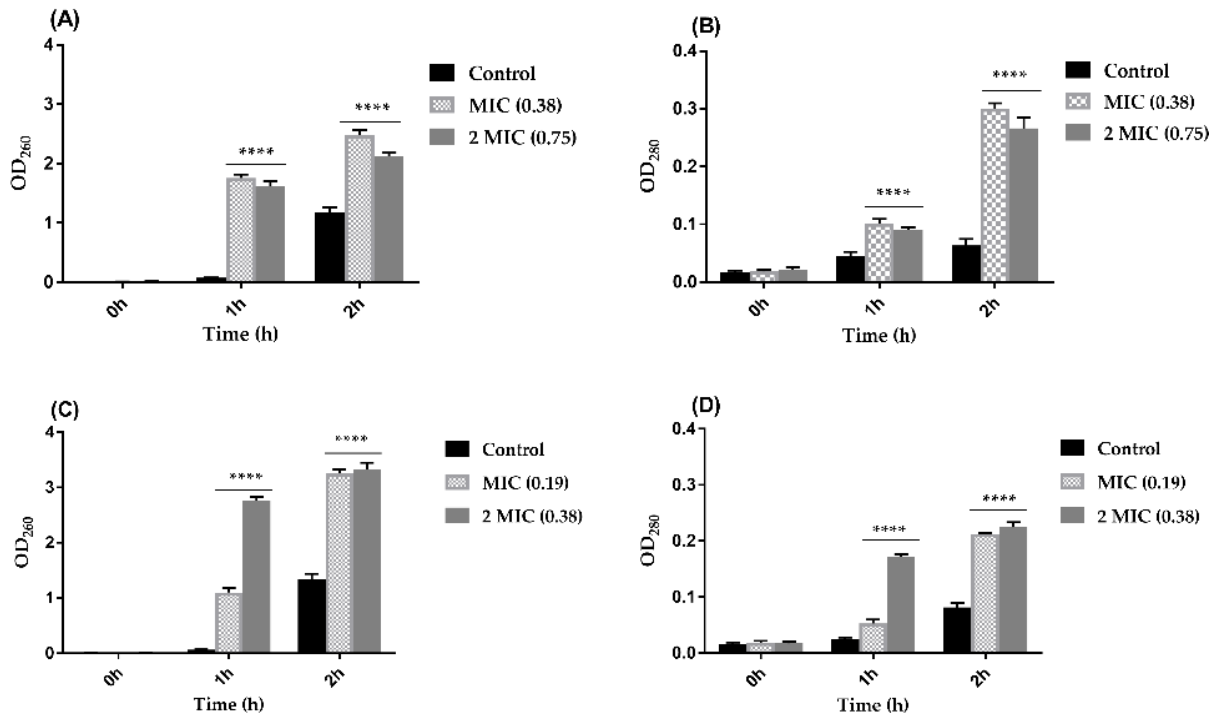


Figure 46. Loss of 260 and 280 nm absorbing material. *A. baumannii* ATCC 19606 cells were treated with AWME3 (A, B) at MIC (0.38 mg/mL), 2 MIC (0.75 mg/mL), respectively. *S. aureus* ATCC 55804 cells were treated with AWME3 (C, D) at MIC (0.19 mg/mL), 2 MIC (0.38 mg/mL), respectively. Data represents mean \pm standard error of mean from three independent experiments. The asterisks denote statistical significance ($p < 0.05$) between the control and the treatments (MIC and 2 MIC) of AWME3 obtained from Dunnett's test. OD: optical density.

7.10. Intracellular ATP leakage

Previous studies demonstrated that intracellular ATP provides energy for the normal physiological activities in microorganisms [386,387]. High Sensitivity Microbial Detection ViaLight® MDA Plus Kit used to measure the bioluminescent ATP that is present in all metabolically active cells. Figure (47A, C) shows that the intracellular ATP concentrations of *A. baumannii* and *S. aureus* ATCC 55804 cells treated with various concentrations of AWME3 at MIC, and 2 MIC incubated for 24 h at 37 °C were significantly reduced ($P < 0.05$) compared to those of control group (untreated bacteria). In addition, with the increase of AWME3 concentrations, the intracellular ATP concentration of tested cells were significantly reduced and p values were in the range (0.0017-0.0001). Likewise, intracellular ATP level in both *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 cells were significantly reduced (**** $p < 0.0001$) when treated with different concentrations of P/S (4.88-39.06 $\mu\text{g/mL}$) as obvious in Figure (47B, D). The decrease of intracellular ATP concentration has been related with the leakage of intracellular ATP, depletion of the intracellular ATP pool, and dissipation of proton motive force components [386,388].

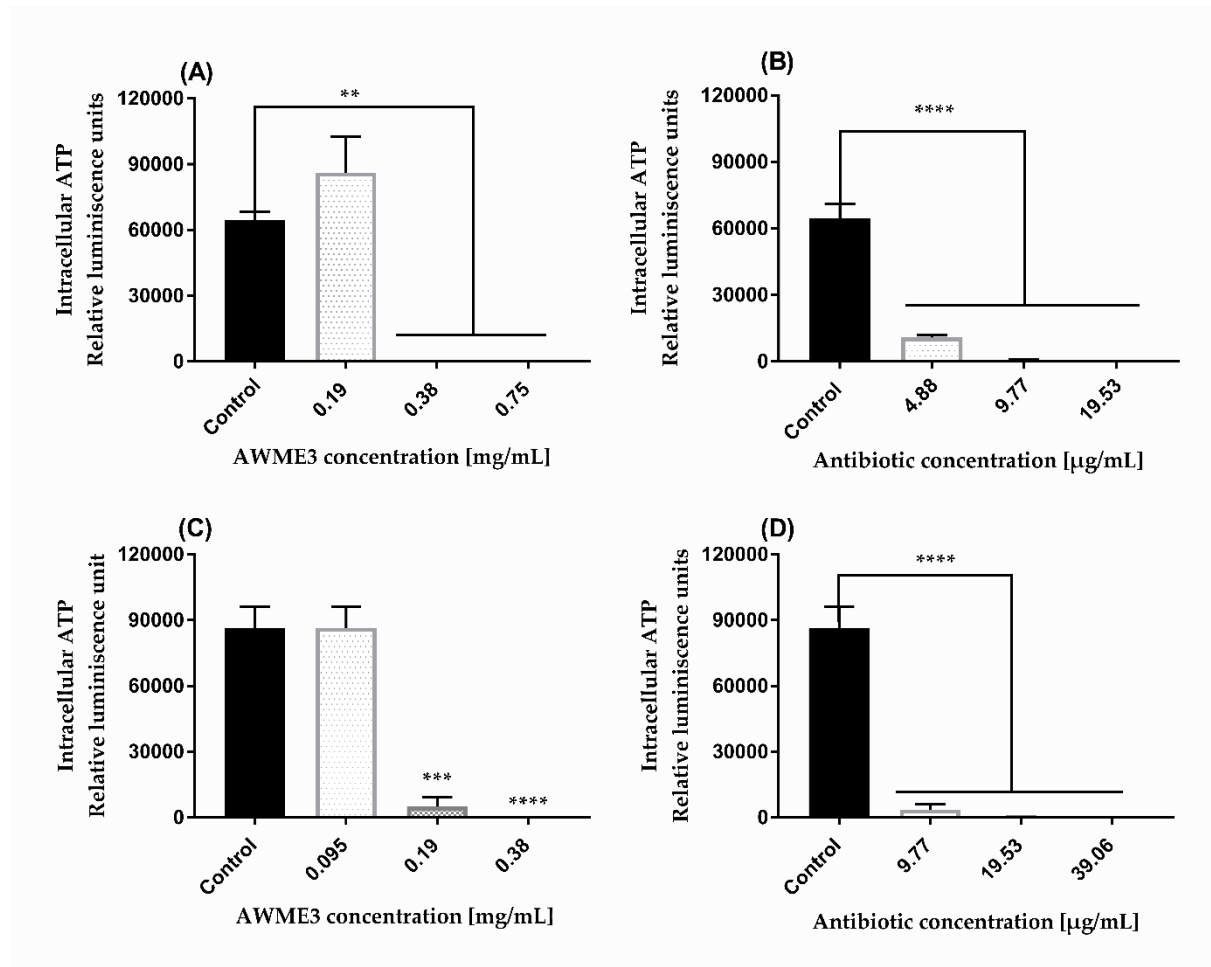


Figure 47. Change in intracellular ATP concentrations presented in metabolic active cells of **(A, B)** *A. baumannii* ATCC 19606 and **(C, D)** *S. aureus* ATCC 55804. Bacterial cells treated with 0.0, 0.5, 1, and 2 MIC of AWME3 extracted sequentially from HI larvae fat **(A, C)**, and bacterial cells treated with 0.0, 0.5, 1, and 2 MIC of the positive control (P/S) **(B, D)** using a bioluminescent method based on the conversion of ATP by luciferase. Values represent the means of independent triplicate measurements. Bars represent the mean values \pm standard error of mean (SEM) from three independent experiments, p values were (** $p=0.0017$, *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$).

7.11. Alteration in cell morphology of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strains treated with AWME3

Among the different microscopy techniques, scanning electron microscopy (SEM) is useful to characterize the cell surface morphology, while transmission electron microscopy (TEM) facilitates characterization of surface morphology along with the density of inner cytoplasmic constituents [389]. To understand the mode of action of fatty acids and its derivatives in AWME3 from HI larvae fat, morphological changes of *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 cells were observed using SEM. The bacterial cells treated with different concentrations of AWME3 which are 0.5 MIC (Figure 48b), MIC (Figure 48c, d, e, f), and 2 MIC (Figure 48g, h, i).

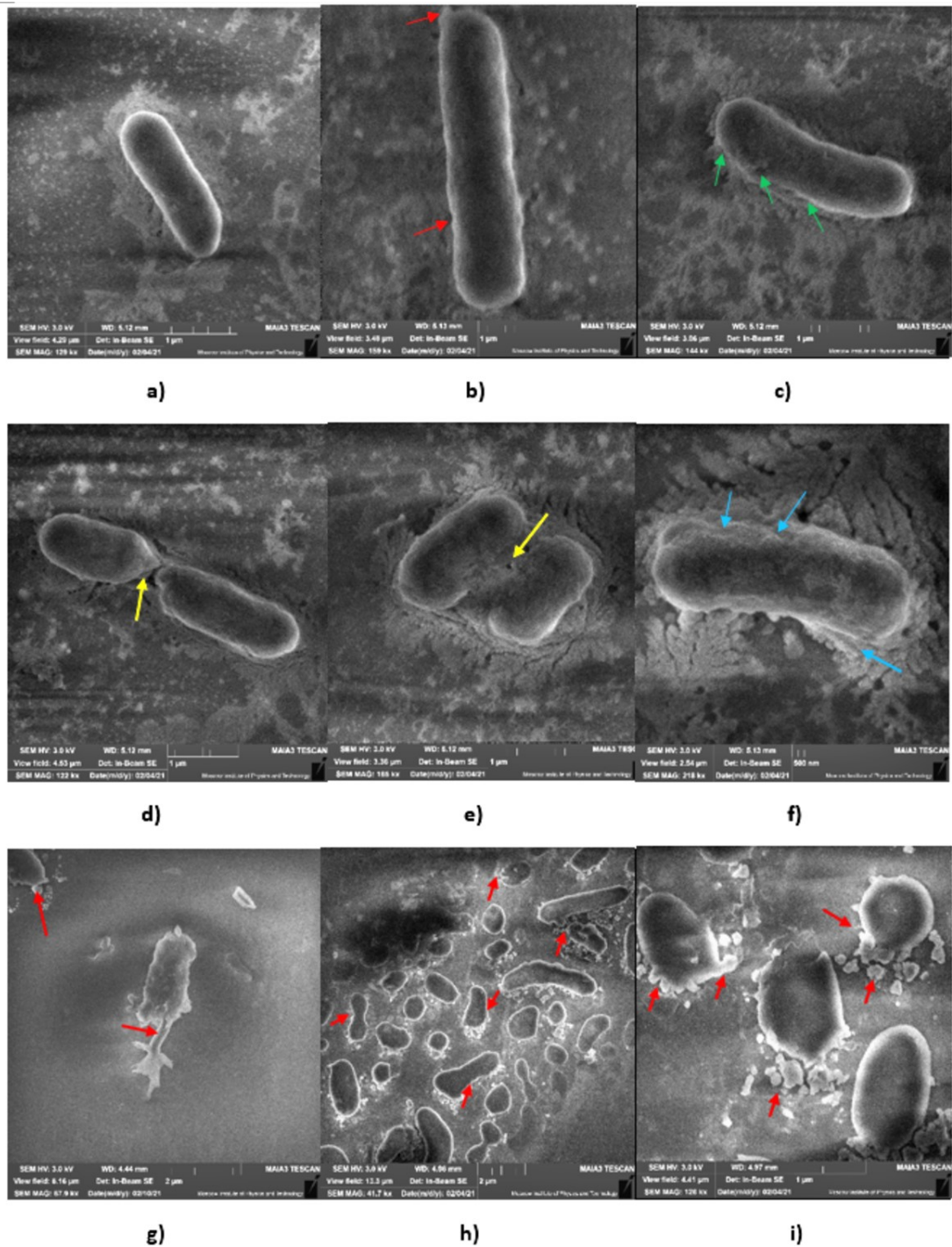


Figure 48. Scanning electron microscopy images of *A. baumannii* ATCC 19606 cells treated with AWME3 at 0.5 MIC, MIC, and 2 MIC; **(a)** Untreated cells; **(b)** Cells treated with 0.5 MIC (0.19 mg/mL) for 12 h; **(c, d, e, f)** Cells treated with MIC (0.38 mg/mL) for 20 min, **(g, h, i)** Cells treated with 2 MIC (0.75 mg/mL) for 10 min. **(a)** Cell wall elongated, wrinkled and rough (red arrows); **(b)** Cell wall ruptured, roughed, and deformed (green arrows); **(d, e)** Cell walls disintegrated, cell septum was asymmetrical (yellow arrows); **(f)** Cell walls injured and lysed in multiple locations (blue arrows); and **(g, h, i)** Released cytoplasmic constituents, lysed cells, cell debris, sever alterations and ghost cells (red arrows).

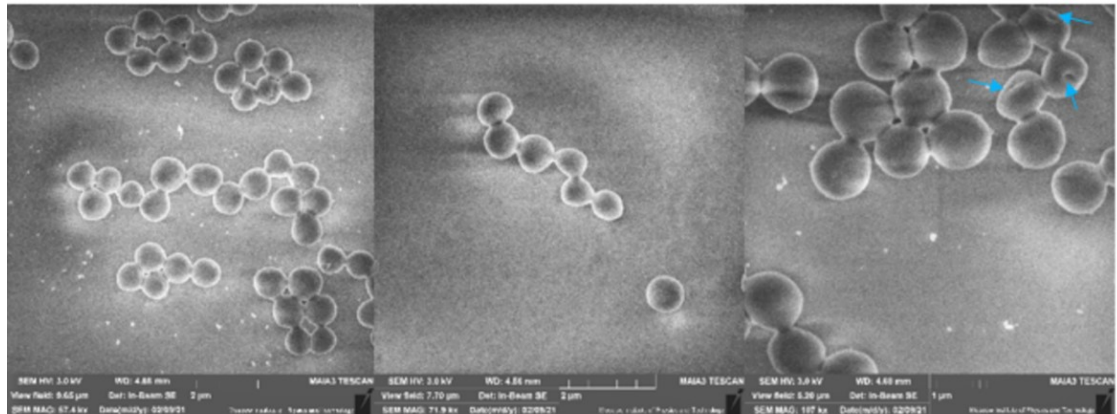
The untreated *A. baumannii* ATCC 19606 displays intact cell walls with smooth membrane surfaces with no perturbation in the membrane structure, a symmetrical, noncurved presented a complete

rod-shaped cell morphology (Figure 48a). By contrast, after incubation with AWME3 at low concentration of 0.5MIC (0.19 mg/mL) and incubation for 12 h, the cell walls appeared to be wrinkled, elongated and low protrusions were formed, compared to the untreated cells (Figure 48b). According to eight pictures, the higher the concentration of AWME3, the more damaging the *A. baumannii* ATCC 19606 cells. After MIC (0.38 mg/mL) treatment for 20 min at 37 °C, cells showed surface roughness and disruption in membrane integrity with visible pores, significant concave and deformation could be detected, cleavages, gaps, and cell separation were disrupted after treatment (Figure 48c, d, e, f). After exposure to 2 MIC (0.76 mg/mL) of AWME3 for 10 min, was observed depression, shrinkage, irregular shapes and even collapse and lysis of cells, compared to control. These findings indicated the bactericidal effect of AWME3 leading to rapid destruction of cell surface structure, cell wall distortions (Figure 48g, h, i), where the cell membrane were completely destroyed, with presence of cell debris. Treatment of *A. baumannii* ATCC 19606 cells (Figure 48g) displays the cytoplasmic material leakage after treatment with 2 MIC of AWME3. At this condition, the mechanism of AWME3 action leads to loss of cellular membrane integrity or function, where the cell membrane was completely destroyed, with presence of cell debris. In particular the outer membranes, are wholly ruptured and collapsed, indicating that the *A. baumannii* ATCC 19606 have been killed owing to the leakage of intracellular contents.

SEM images of *S. aureus* ATCC 55804 cells were taken at 12 h for MIC, 20 min for 2 MIC, and 10 min for 4 MIC of AWME3 and incubated at 37 °C to study the possible mechanism(s) of action of AWME3 of HI larvae fat on bacterial cells. As shown in Figure 49, the surfaces of the untreated cells of planktonic *S. aureus* ATCC 55804 were relatively smooth and continuous with good structural integrity, intact and with completely spherical shape (Figure 49a, b). After the treatment of *S. aureus* ATCC 55804 cells with 0.5 MIC of AWME3, small pores were detected obviously, cells still smooth, spherical, intact, and minor morphological changes occurred (Figure 49c). Protrusions like those that buds formed on the cell surface, the membrane became corrugated and/or partially swelled whereas MIC (0.19 mg/mL) of AWME3 treatment for 12 h min caused severe morphological changes with late cell division (Figure 49c).

The cell boundaries were faint and unclear when treated with the bactericidal 2MIC (0.38 mg/mL) of AWME3 for 20 min, where the cells were collapsed, roughed, wrinkled, and deformed, furthermore, irregular shapes, gaps, and vacuoles were obvious after treatment (Figure 49e, f, g). When the concentration of AWME3 reached 4 MIC (0.75 mg/mL), the *S. aureus* c ATCC 55804 cells appeared indentations, blebs, collapsed, lysis, and non-integral cell morphology (Figure 49g, h, i). Ghost cells appeared due to the loose of the cytoplasmic material. These results showed that AWME3 caused obvious destruction on cell wall/membrane of *S. aureus* ATCC 55804, indicating that the components of cell walls/membranes of *S. aureus* ATCC 55804 have severe alterations with obvious changes. Based on these results AWME3 interact directly with microbial cell walls/membranes to increase the membrane

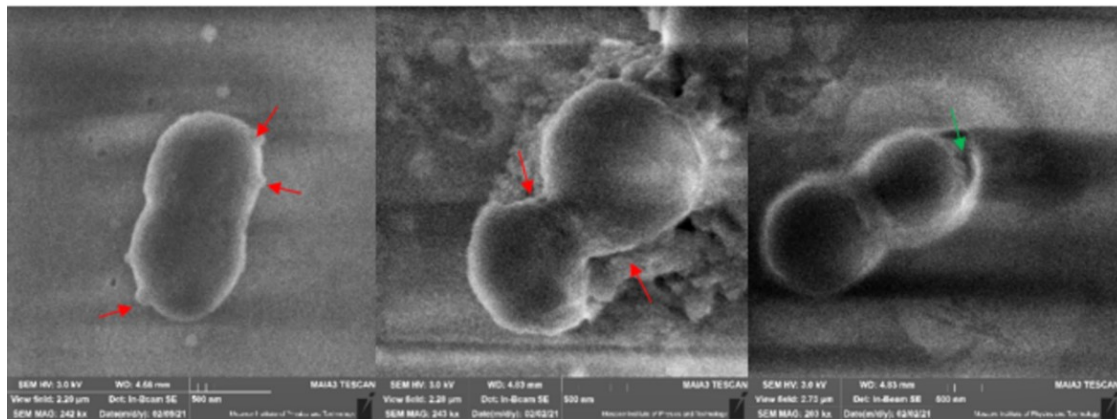
permeability and cause rapid cell death. A significant number of *S. aureus* ATCC 55804 cells failed to retain their oval shapes after treatment with 0.75 mg/mL of AWME3. The formation of ghost cells with distorted cell walls indicated the bactericidal action of the AWME3. These results suggested that interference with cell membrane permeability affected the viability of the cells. Based on the results this phenomenon suggests that the active substances from AWME3 from Hi larvae fat may act on the cell membrane or extracellular proteins, generating small pores and leading to the destruction of the bacterial cell growth.



a)

b)

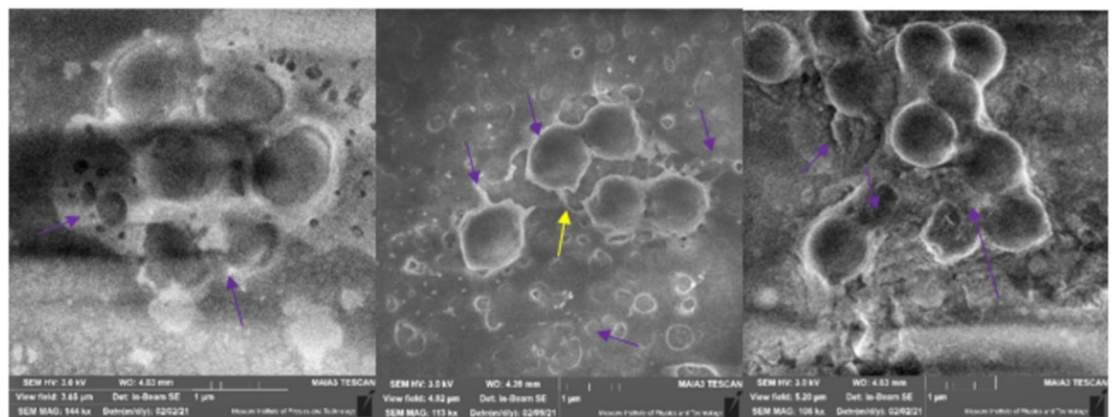
c)



d)

e)

f)



g)

h)

i)

Figure 49. SEM images of *S. aureus* ATCC 55804 cells. **(a, b)** Untreated control; **(c)** Treated with MIC (0.19 mg/mL) for 12 h.; **(d, e, f, g)** Treated with 2 MIC (0.38 mg/mL) of AWME3 for 20 min; **(g, h, i)** Treated with 4 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3 for 10 min. Blue arrows show small pores formed inside the cell membrane, red arrows indicate cell wall swelling and collapsing, green arrow refers to vacuole or periplasmic space formation and cell wall deformation, violet arrows demonstrate lysed cells, cell wall ruptured completely, cell debris, and yellow arrow shows blebs and loosed intracellular compartments.

7.12. Alterations of cell compartments of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strains after exposing to AWME3

Electron microscopy is a popular measurement technique for investigating the morphological structure of bacterial cell samples and can be utilized to study the effects of antimicrobial lipid treatment [389]. Among the different techniques, transmission electron microscopy (TEM) facilitates characterization of surface morphology along with the density of inner cytoplasmic constituents. To prove our hypothesis that AWME3 considers antibacterial agent, which disrupt the bacterial cell wall/cell membrane, and to confirm the damage of the *A. baumannii* ATCC 19606 membranes, TEM micrographs used to achieve our hypothesis. TEM micrographs show that the outer cell membrane and inner cell membrane of untreated *A. baumannii* ATCC 19606 bacteria appeared bacilli or cocco-bacilli intact and the cell walls are clearly visible thick. More importantly, the electron density in the cytoplasmic region is darker in the cell wall region, which showed thicker and more electron-dense peptidoglycan layer (Figure 50a).

All concentrations of AWME3 display significant damage effect to bacterial cells. After treatment with a low concentration of AWME3 (0.5 MIC) for 12 h, vacuoles (red arrows) and pili (yellow arrows) were detected (Figure 50b). Exposure to MIC of AWME3 for 30 min induced a strong condensation and darkening of intracellular material associated to the inner layer of cytoplasmic membrane with the appearance of periplasmic spaces (red arrows), vacuoles and pili disappeared (Figure 50c). When *A. baumannii* ATCC 19606 treated with 2 MIC of AWME3 for 20 min, there was no clear distinction between the inner cytoplasmic membrane and the outer cell membrane (red arrows) (Figure 50d). The cytoplasmic material was condensed at the centre of the cell (yellow arrow), the disintegration of bacteria membrane at polar ends as well as cytoplasm leakage; ruptured cell wall and membrane in multiple locations (blue arrows) were observed (Figure 50e). Cell nucleoids (low electronic density area) were disintegrated, and the cytoplasmic matrix (high electronic density area) was sparse. Furthermore, irregular morphological structures including shrinking of the cell size, cell wall was deformed, cell membrane was ruptured (black arrows), high electron density of cytoplasmic materials were condensed at the centre of the treated cells (Figure 50f), in addition lysed cells, cell wall, and cell debris were detected after treatment with 2 MIC of AWME3. Exposure to high concentration 4 MIC (1.5 mg/mL) of

AWME3 for 10 min led to completely degradation of the cell wall, heterogeneous cytoplasmic density and dissolved cell membrane structure were also observed (red arrows). Additionally, ghost cells appeared after cytoplasmic material leakage (Figure 50g, h). These results confirm the rapid reaction between the AWME3 and the cell wall (peptidoglycan), cell membrane and the cytoplasmic material of *A. baumannii* ATCC 19606. These data confirm the destruction of *A. baumannii* ATCC 19606 membrane by AWME3 via cell wall damage, membrane permeability, and cytoplasmic material leakage.

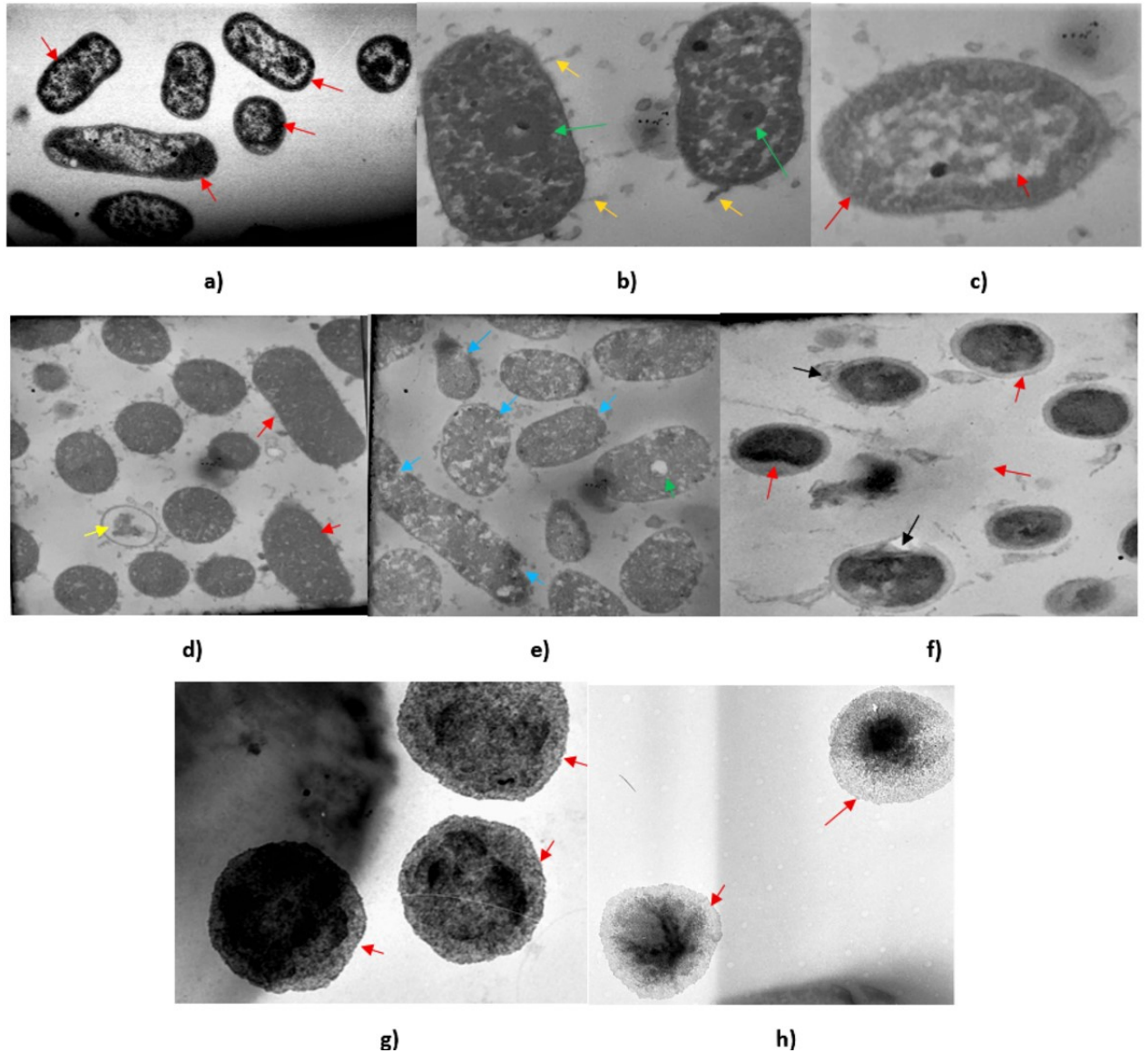


Figure 50. TEM micrographs of *A. baumannii* ATCC 19606 suspended in either PBS (**a**) or exposed to AWME3 (**b-h**). Intact thick cell wall and cell membrane were present in control sample. (**a**) Cell wall or cell membrane appeared more thin and large vacuoles were formed after treatment with 0.5 MIC of AWME3 (0.19 mg/mL) for 12 h; (**b**) Depletion and shrinkage in the cytoplasmic material after treatment with MIC (0.38 mg/mL) for 1 h; (**c, d, e, f**) Degradation of the cell wall and cell membrane, in addition fragile cytoplasmic material due to exposure to 2MIC (0.75 mg/mL) of AWME3 for 30 min; (**g, h**) Completely decomposition and losing of the cell walls and the cell membrane after bacteria subjected to 4 MIC (1.5 mg/mL) for 10 min.

The membrane damage was obvious in Figure 51, where the homogeneous cell walls with intact cytoplasm can be observed by TEM. Untreated cells of *S. aureus* ATCC 55804 grown under culture medium displayed the typical features of *Staphylococci* morphology: smooth rounded cells with an intact thick cell wall envelope and well-defined membranes (Figure 51a).

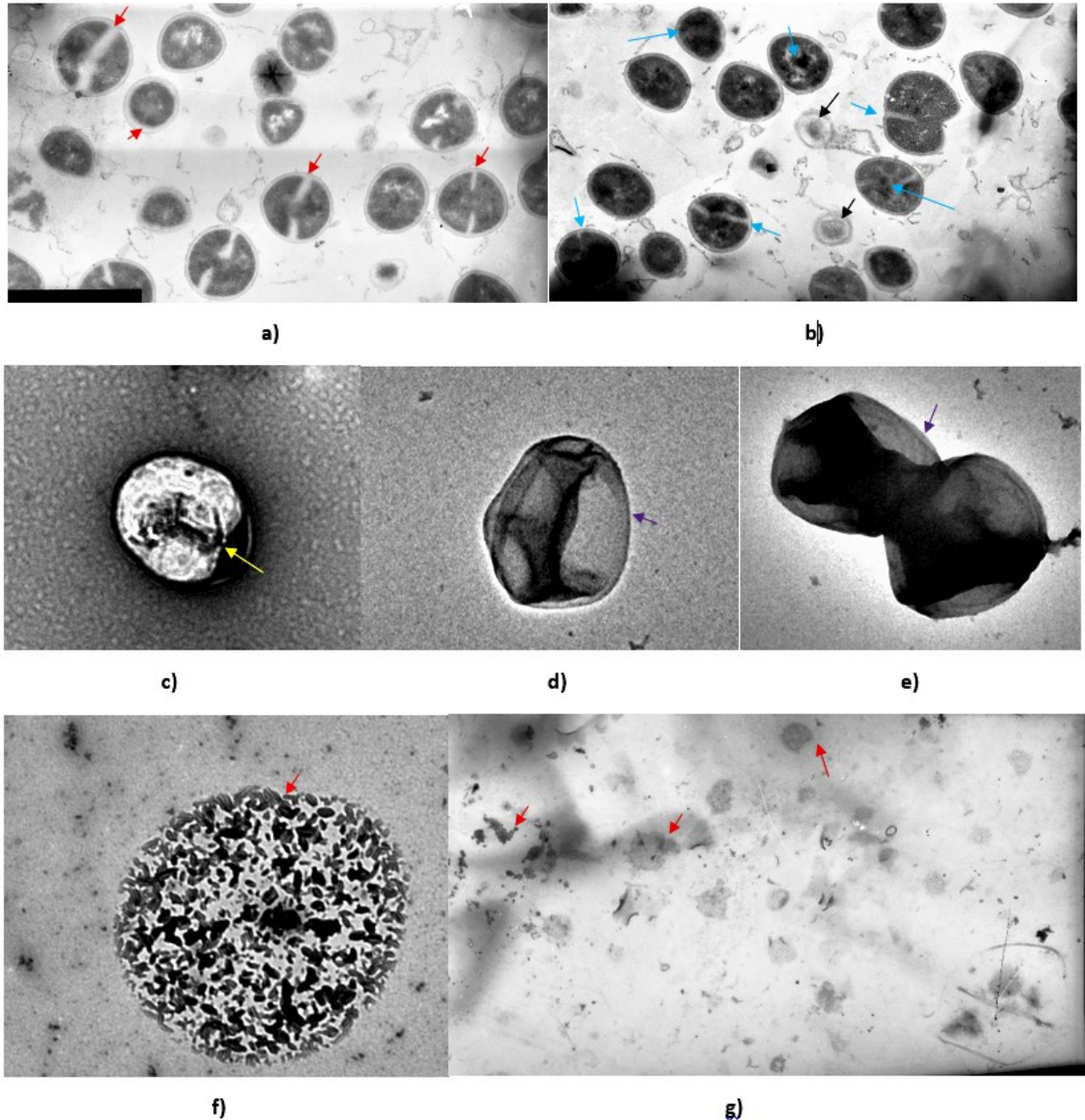


Figure 51. TEM micrographs of untreated and treated *S. aureus* ATCC 55804. Untreated cells looked round and intact, with a well-defined cell membrane and the red arrows indicate intact septa (a). The onset of septation (red arrows) and the cross-wall formation was noticed. After treatment for 12 h with the MIC (0.19 mg/mL) of the AWME3; (b, c) Cells appeared malformed with shrunken cytoplasmic material and aberrant septa; (d, e) Cells appeared with non-membrane-enclosed bodies (denoted by violet arrows) after treatment with 2MIC (0.38 mg/mL) for 30 min. Some lysed cells were also noted (f), as well as null cells (g) were also noted after treatment with 4MIC (0.75 mg/mL) for 10 min.

The cytosol exhibited a homogeneous electron density and proliferating cells with a central septum (red arrows) were commonly observed. The cell wall showed a dipartite structure consisting of an outer

layer that shows highly stained fibrous surface, an electron dense inner thin zone. Micrographs of untreated *S. aureus* ATCC 55804 cells showed well defined septa formation occurring primarily through the middle of the cell, dividing the cell into two symmetrical daughter cells (Figure 51a). Cells exhibited more diffuse septa and predominantly more “asymmetrical” cell divisions (blue arrows), treatment with MIC of AWME3 for 12 h affects cells, which displayed rough surface and the electron density in the cytoplasm appeared to be dark, heterogeneous (Figure 51b). Cells appeared abnormal with wrinkled walls, enlarged, periplasmic spaces (black arrows) appeared in small cells with shrunken cytoplasm (Figure 51b), compared to the untreated cells. Cytoplasmic material was condensed at the centre of the cell with presence a large cavity (yellow arrow) at the anterior of the cell, appearance of clear zone and retained the outer cell membrane (Figure 51c). After treatment with 2 MIC of AWME3 for 20 min, cell wall and cell membrane appeared undistinguished or loosed, in addition dark condensed cytoplasmic compartments appeared heterogeneous, shrunken, and wrinkled cell walls (violet arrows) as shown in Figure (51d, e). Exposure to high concentration 4 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3 for 10 min led to completely degradation of the cell wall and cell membrane, dissociation of the intracellular content with rough surface (Figure 51f), moreover, *S. aureus* ATCC 55804 cells lysed completely, and cell debris were detected (Figure 51g). The findings above further confirmed the disintegrating process of cell interior structure, which were consistent with the findings in SEM examination, and obvious reaction happened between the AWME3 and cell wall membrane, which led to disintegration and cell death.

7.13. Atomic Force Microscopy

To study the possible effects of AWME3 on Gram-positive (*S. aureus* ATCC 55804) and Gram-negative (*A. baumannii* ATCC 19606) cells at the level of micro- or nano-scale we used atomic force microscopy (AFM). AFM is an extremely useful tool for analysing the two and three-dimensional topography of biological samples, including bacteria. The technique allows the characterization of the bacterial cell surface producing high-resolution topographical imaging with minimal sample disruption [390]. In this study we analysed and detected the morphological characteristics of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 based on the measurement of the calculated seven selected parameters including, length (μm), width (μm), height (nm), surface roughness (nm), root mean square (RMS) of surface, Kurtosis (Ska), and the Skewness (Ssk).

7.13.1. AFM images of *S. aureus* ATCC 55804 control cells

The AFM images of freshly prepared untreated *S. aureus* ATCC 55804 shows a typical spherical or cocci morphology, with a relatively smooth surface and no alterations (Figure 52a). Cell wall and cell membrane appeared intact with no ruptures or large pores (black arrows) (Figure 52a, d).

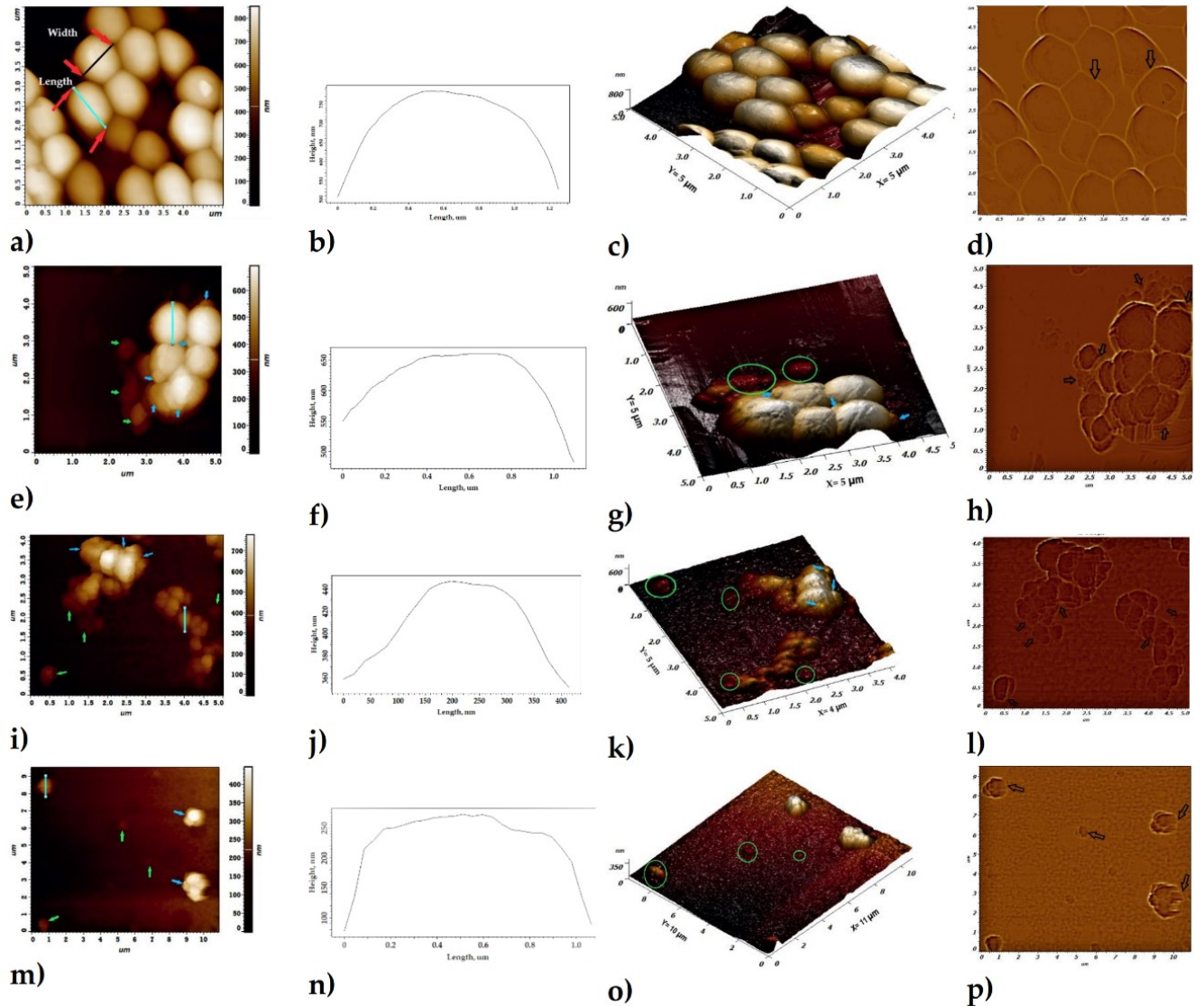


Figure 52. Morphological changes induced by AWME3 against *S. aureus* ATCC 55804 bacteria. Control (a), treated MIC (e) for 12 h, 2 MIC for 20 min (i), and with 4 MIC for 10 min (m) of AWME3: topography (a, e, i, m), cross section (b, f, j, n) and three dimensional (c, g, k, o), edge enhancement, laplacian 5×5 (d, h, l, p) images. Blue arrowheads show the degradation of the cell walls, green arrowheads indicate the lysed cells and debris of cells in 2 D images at the left panel. Green cycles indicate the lysed cells in 3D images, and the transparent black arrowheads refer to the cell walls damage of *S. aureus* ATCC 55804 exposed to different concentrations (0.19-0.75 mg/mL) of AWME3 at the right panel.

7.13.2. AFM images of *S. aureus* ATCC 55804 cells treated by AWME3 at low concentrations

At the low concentration of AWME3 (0.19 mg/mL), the initial morphological changes observed are that of indentations appearing on the surface of some cells as well as some micelle-like structures or outer membrane residues found around or anchored on the cells (blue arrows (Figure 52e)). This indicates the disruption of the outer membrane of the bacteria, probably due to direct interaction and binding of AWME3 to the peptidoglycan, which is specific to Gram-positive bacteria. This

perturbation may have damaged the outer membrane, thus exposing the peptidoglycan wall beneath it. The bacterial cultures treated with MIC (0.19 mg/mL) of AWME3 and examined by AFM showed evidence of morphological changes induced at membrane level by fatty acids action which were the most abundant in the AWME3 (Figure 52e).

The AFM images allowed us to determine and compare the bacterial cell dimension, but also provided details on cell surface topology. Significant decrease (**** $p < 0.0001$) was observed in the cell dimension of *S. aureus* ATCC 55804 when it was treated with 0.19 mg/mL of AWME3 for 12 h. The cell length and width of treated *S. aureus* cells were $0.94 \pm 0.19 \mu\text{m}$ and $0.89 \pm 0.17 \mu\text{m}$, respectively, compared to the untreated *S. aureus* ATCC 55804 cells, which were $1.1 \pm 0.16 \mu\text{m}$ and $1.15 \pm 0.14 \mu\text{m}$, respectively (Table 27, Figure 53A, B).

Table 27. Morphological characteristics of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606 strains at different concentrations of AWME3

Strain	AWME3 (mg/mL)	Length (μm)	Width (μm)	Height (nm)	Ra (nm)	Ska	Ssk	RMS (nm)
<i>S. aureus</i> ATCC 55804	Control	1.1 ± 0.16	1.15 ± 0.14	762.9 ± 99.1	43.17 ± 9.1	15.15 ± 4.3	3.3 ± 0.67	126.4 ± 22.6
	0.19	0.94 ± 0.19	0.89 ± 0.17	566.5 ± 90.9	56.91 ± 13.8	4.39 ± 0.59	1.37 ± 0.19	178.03 ± 25.6
	0.38	0.76 ± 0.22	0.68 ± 0.17	476.9 ± 32.4	73.9 ± 15.2	6.6 ± 2.64	1.81 ± 0.58	126.03 ± 44.1
	0.75	0.59 ± 0.18	0.55 ± 0.15	238.8 ± 66.5	16.59 ± 5.7	17.97 ± 2.9	3.64 ± 0.78	43.67 ± 15
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	Control	2.18 ± 0.32	1.15 ± 0.19	776.6 ± 128.3	19.9 ± 5.6	4.12 ± 2.9	1.17 ± 0.56	102.8 ± 18.5
	0.19	2.7 ± 1.4	0.93 ± 0.18	471.2 ± 108.6	49.2 ± 18.9	8.37 ± 4.2	2.29 ± 0.69	143.08 ± 35.6
	0.38	2.08 ± 0.6	0.82 ± 0.21	383 ± 81.1	56.4 ± 13.8	11.9 ± 6.4	2.9 ± 0.87	109.8 ± 16
	0.75	1.59 ± 0.67	0.79 ± 0.34	162.4 ± 75.4	14.4 ± 4.4	6.7 ± 3.8	1.59 ± 0.66	104.1 ± 40.2

Abbreviations: Ra; Roughness average, Ska; kurtosis average, Ssk; Surface skewness, RMS; root mean square of surfaces

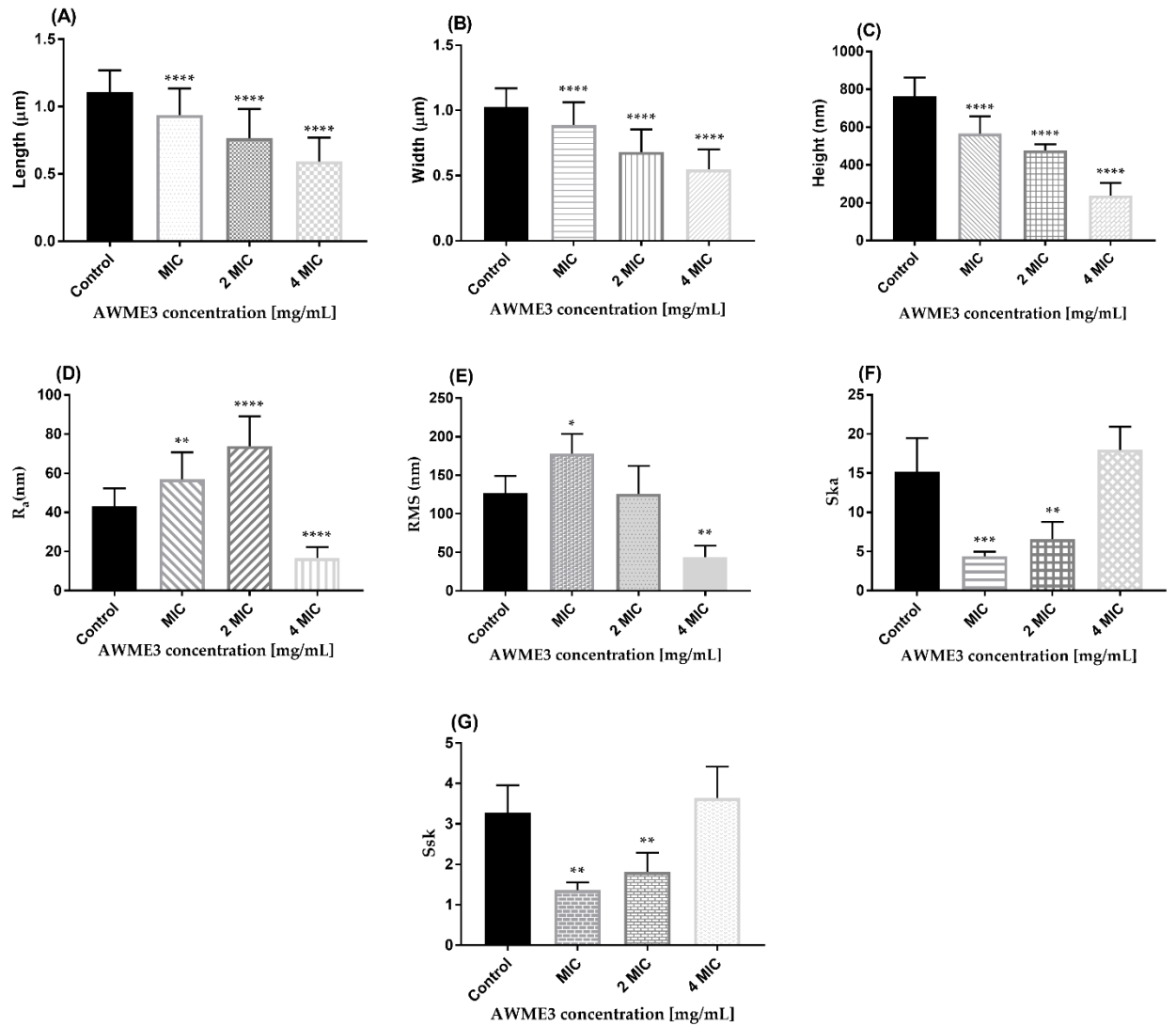


Figure 53. Cell dimensions length (A), width (B), height (C), roughness (D), root mean square of surface-RMS (E), Kurtosis-Ska (F), Skewness-Ssk (G) measurements from multiple images of control bacteria ($n = 50$) and 0.19 mg/mL (MIC), 0.38 mg/mL (2 MIC), and 0.75 mg/mL (4 MIC) of AWME3 isolated from HI larvae fat treated bacteria ($n = 50$). All images of AFM obtained from two independent experiments, Graph Pad Prism was used to build up all graphs and one way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test for statistical comparison between treated and untreated (control) *S. aureus* ATCC 55804 cells, all data are the average \pm standard deviation, p value (* $p=0.041$ -**** $p < 0.0001$).

Some fluids and debris were detected around the apical end of the cells as shown in Figure 52e; furthermore, cell wall and cytoplasmic membrane were damaged and collapsed in multiple locations (Figure 52h). At higher AWME3 concentrations (0.38 and 0.75 mg/mL), the perturbations observed on the cell surface are more evident. Bacteria are severely affected (Figure 52i, k, l), where cell wall and cell membrane were degraded and broken, lysed cells, cell debris were formed. A great significant reduction (**** $p < 0.0001$) in the cell dimension was observed (Figure 53), where the cell length and width decreased to $0.76 \pm 0.22 \mu\text{m}$, and $0.68 \pm 0.17 \mu\text{m}$, respectively, when *S. aureus* ATCC 55804 cells subjected

to 2 MIC (0.38 mg/mL) of AWME3 (Table 27, Figure 53A, B). In other cases, the collapse of the whole cell was evident and observed in the 2D, 3D images (Figure 52i, k, l). High-resolution images of the cell surface show severe damage triggered by AWME3 exposure (Figure 52i, k, l, m, o, p), in comparison with those of the control cells (Figure 52a, c, d). High shrinkage (0.47 %, 53%) in the length and the width (0.59 ± 0.18 , 0.55 ± 0.15 μm), respectively of *S. aureus* ATCC 55804 cells, when they were subjected to 4 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3.

7.13.3. Decreasing of *S. aureus* ATCC 55804 cells dimensions under AWME3 treatment

Changes in the dimensions of the bacteria were quantified by measuring, from the AFM topography images (Figures 52b, f, j, n), the cellular height of two independent experiments ($n=30$ bacteria per treatment). The height was estimated through the cross-section profile for each bacteria recorded. The analysis of height distribution shows that the average height of untreated *S. aureus* ATCC 55804 cells was 762.9 ± 99.1 nm (Figure 52b). However, when treatments with AWME3 were applied, a high significant decrease ($****p<0.0001$) to 566.5 ± 90.9 nm, when bacterial cells were treated with MIC (0.19 mg/mL) for 12 h (Figures 52b, 54C). At high concentrations of AWME3, sever reduction in height values (476.9 ± 32.4 nm, 238.8 ± 66.5 nm) were recorded and a great significant ($****p<0.0001$) was observed when *S. aureus* ATCC 55804 cells treated with 2 MIC (0.38 mg/mL) and 4 MIC (0.75 mg/mL), respectively compared to the control group (Table 27, Figure 52j, n, and Figure 53C). Shrinkage ratio for treated *S. aureus* ATCC 55804 cells were calculated based on the height values, recorded 27.1 %, 37.5%, and 68.7%, when bacterial cells were exposed to 0.19 mg/mL, 38 mg/mL, and 0.75 mg/mL of AWME3, respectively. Therefore, the height reduction observed in *S. aureus* ATCC 55804 cells after the treatment with AWME3 suggests shrinkage in the volume of *S. aureus* ATCC 55804 cells, probably due to loss of intracellular materials by cells collapse.

7.13.4. Changes in bacterial surface roughness (Ra) and root mean square of roughness (RMS) values

The AFM images revealed that the surface roughness values of treated *S. aureus* ATCC 55804 cells increased, where the average roughness for the untreated cells is 43.17 ± 9.1 nm for *S. aureus* ATCC 55804. When *S. aureus* ATCC 55804 cells exposed to 0.19 mg/mL and 0.38 mg/mL, a good significant ($**p=0.001$) increase in the average of surface roughness of MDR *S. aureus* ATCC 55804 with 1.3 fold greater than untreated bacteria to be 56.91 ± 13.8 nm (Table 27, Figure 53D). The highest significant ($****p<0.0001$) increase in the roughness surface of *S. aureus* ATCC 55804 cells was 73.9 ± 15.2 nm, which was 1.7 fold greater than the untreated cells, when *S. aureus* ATCC 55804 exposed to 0.38 mg/mL of AWME3. Sharply significant decrease ($****p<0.0001$) in the roughness recorded 16.59 ± 5.7 nm with

shrinkage (62%), when *S. aureus* cells ATCC 55804 treated with 0.75 mg/mL of AWME3 for 10 min (Table 27, Figure 53D). High resolution images of *S. aureus* ATCC 55804 show high disturbances and big alterations in the morphological characteristics of treated *S. aureus* ATCC 55804 cells (Figure 52e, g, h, i, k, l, m, o, p) compared to the control group (Figure 52a, c, d). Bacterial surface roughness, termed as RMS value, was another quantitative parameter to evaluate the cell surface morphology. The results in Table 27 showed that the tested bacteria had rough surfaces. For the control group of *S. aureus* ATCC 55804 strain cells, its average RMS roughness value recorded 126.4 ± 22.6 nm, while a significant increase (* $p=0.041$) in RMS index was observed when *S. aureus* ATCC 55804 cells were treated with MIC (0.19 mg/mL) of AWME3 to be 178.03 ± 25.6 nm. At the highest concentration 4 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3, great significant decrease (* $p=0.0019$) in the value of RMS to be 43.67 ± 15 nm, while no significant difference recorded when the cells were exposed to 2 MIC (0.38 mg/mL) compared to untreated bacterial cells (Table 27, Figure 53E).

7.13.5. Changes of *S. aureus* ATCC 55804 cells morphology parameters

Bacterial shape parameters including, Ska, and Ssk, where these parameters are able to determine the shape irregularities. Ska Kurtosis parameter was significantly decreased (** $p=0.0005$, ** $p=0.003$), when *S. aureus* ATCC 55804 cells were treated with MIC (0.19 mg/mL) and 2 MIC (0.38 mg/mL) of AWME3, to be 4.39 ± 0.59 , 6.6 ± 2.64 , respectively compared to the untreated cells (15.15 ± 4.3). In contrast, when *S. aureus* ATCC 55804 cells were treated with high concentration 4 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3, no statistical difference for Ska (17.97 ± 2.95) was significant compared to the control group (Table 27, Figure 53F). In addition, Ssk skewness decreased sharply and recorded (1.37 ± 0.19 , 1.81 ± 0.58), when bacterial cells of *S. aureus* ATCC 55804 subjected to 0.19 mg/mL, and 0.38 mg/mL, respectively with a good significant difference (** $p=0.001$, ** $p=0.009$), respectively compared to the untreated cells (3.3 ± 0.67). On the other hand, no significant difference was observed in Ssk parameter (3.64 ± 0.78), when *S. aureus* ATCC 55804 cells were treated with 0.75 mg/mL for 10 minutes, compared to the control group (Table 27, Figure 53F). Total cell damage is observed at the highest concentration of AWME3 assayed (75 mg/mL) (Figure 52m, o, p). High-resolution images of the cell surface show severe damage triggered by AWME3 exposure (Figure 52m, o, p) in comparison with those of the control cells (Figure 52a, c, d). Thus, the topographical changes observed in the bacterial cells become more pronounced as the concentration of AWME3 used in the treatment increases. Moreover, a clean substrate surface is observed as background around the untreated cells (Figures 52a, c, d). In contrast, small granules or aggregates are observed on the polymeric support close to the AWME3-treated cells (Figures 52i, k, l, m, o, p). This behaviour is concomitant with the damage of cell integrity, suggesting that the aggregates could correspond to intracellular content and/or cellular debris.

7.13.6. AFM images of *A. baumannii* ATCC 19606 control cells

The morphological effects, of AWME3 on the Gram-negative *A. baumannii* ATCC 19606 strain are presented in Table 27 and Figure 54.

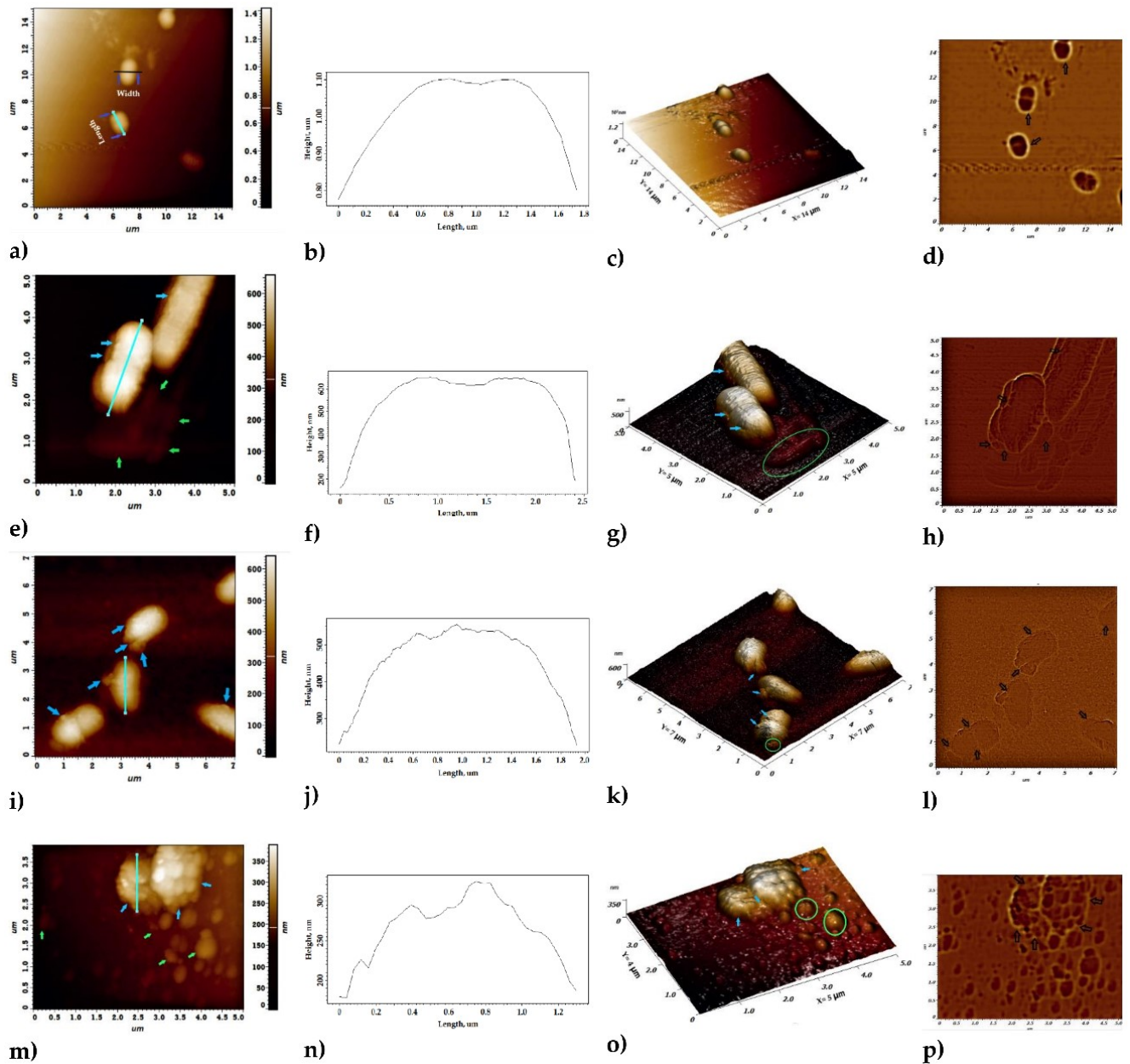


Figure 54. Representative images of morphological changes induced by AWME3 against *A. baumannii* ATCC 19606 bacteria. Control (a), treated with 0.5 MIC (0.19 mg/mL) for 12 h (e), MIC (0.38 mg/mL) for 20 min (i), and with 2 MIC (0.75 mg/mL) for 10 min (m) of AWME3: topography (a, e, i, m), cross section (b, f, j, n) and three dimensional (c, g, k, o), edge enhancement, laplacian 5×5 (d, h, i, p) images. Blue arrowheads show the degradation of the cell walls, green arrowheads indicate the lysed cells and debris of cells in 2 D images at the left panel. Green cycles indicate the lysed cells in 3D images, and the transparent black arrowheads refer to the cell walls damage of *A. baumannii* ATCC 19606 exposed to different concentrations (0.19-1.5 mg/mL) of AWME3 at the right panel. Cell elongation phenomena is obvious, when the *A. baumannii* ATCC 19606 cells subjected to 0.5 MIC of AWME3 a long period (12 h) (e).

High resolution representative images were selected from two independent cultures, results show analysis of these seven parameters, which were observed on at least 50 bacteria cells collected from two independent cultures. Threshold method was used to determine the cell dimension (length, width) of *A. baumannii* ATCC 19606 cells. Planktonic bacterial cells in native conditions (without treatment) show a smooth surface, with intact cell walls, and coccobacilli. Bacterial cells appeared close to each other and distinctly similar in the same image (Figure 54a, c, d). Cell walls and membranes were intact without any rupture or damage, distinguished with regular septum division located in the centre of the cells and divide the cell into two symmetrical parts (Figure 54c, d). Untreated cells were investigated with an average cell length of $2.18 \pm 0.32 \mu\text{m}$, width of $1.15 \pm 0.19 \mu\text{m}$, and a maximum height of $776.6 \pm 128.3 \text{ nm}$ for 50 cells (Table 27, Figure 54b, Figure 55A, B, C), representative of the investigated *A. baumannii* ATCC 19606 strain.

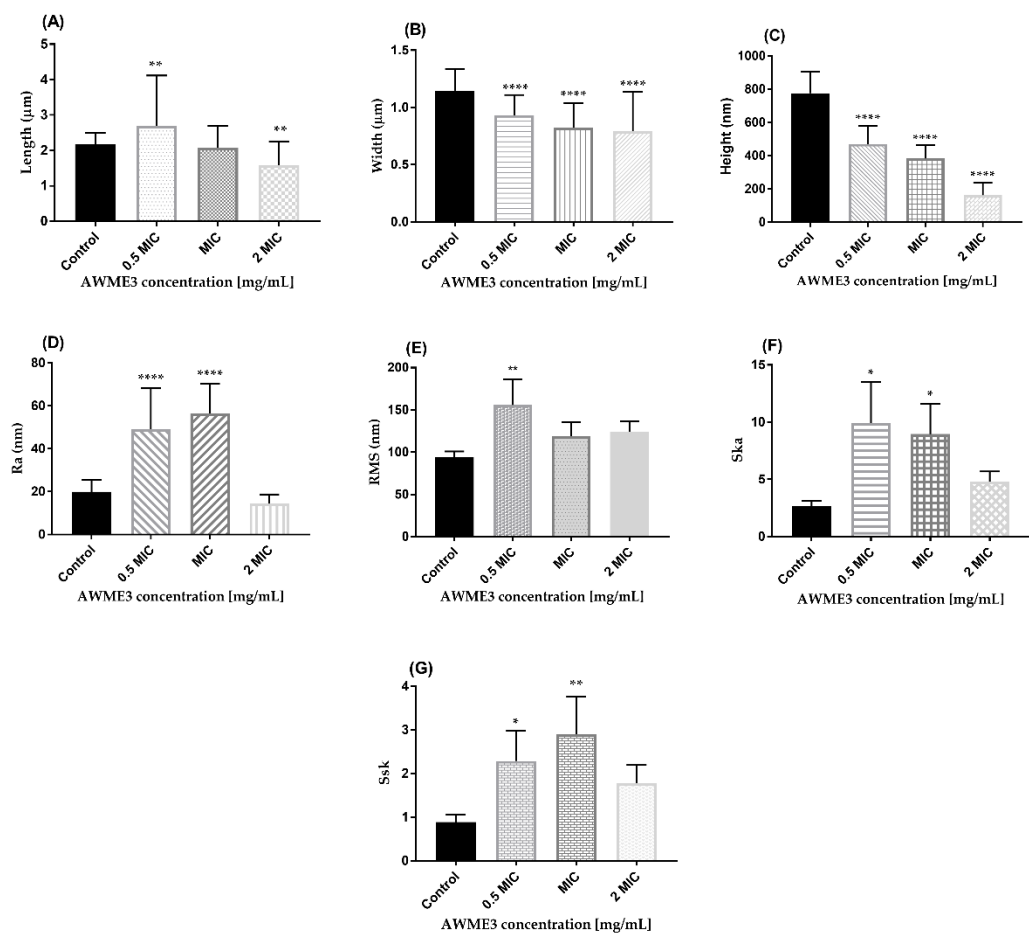


Figure 55. Cell dimensions length (A), width (B), height (C), roughness (D), root mean square of surface-RMS (E), Kurtosis-Ska (F), Skewness –Ssk (G) measurements from multiple images of control bacteria (n = 50) and 0.19 mg/mL (0.5 MIC), 0.38 mg/mL (MIC), and 0.75 mg/mL (2 MIC) of AWME3 isolated from HI larvae fat treated bacteria (n = 50). All images of AFM obtained from two independent experiments, Graph Pad Prism was used to build up all graphs and one way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test for statistical comparison between treated and untreated (control) *A. baumannii* ATCC 19606 cells, all data are the average \pm standard deviation, p value (*p=0.041-****p < 0.0001).

The average surface corrugation (roughness-Ra) of an untreated *A. baumannii* ATCC 19606 cell was determined to be 19.9 ± 5.6 nm (Table 27, Figure 55D). Root mean square (RMS) roughness measured by AFM was correlated with the roughness of the RMS average for untreated *A. baumannii* ATCC 19606, which was 102.8 ± 18.5 nm. The bacterial cell shape parameters Ska and Ssk were calculated and measured by 3D roughness analysis of images using the program 3.5.0.19426 (NT-MDT Co, Amsterdam, Netherlands) and revealed as 4.12 ± 2.9 and 1.17 ± 0.56 , respectively (Table 27, Figure 55E, F, G).

7.13.7. Effect of low AWME3 concentrations on the *A. baumannii* ATCC 19606 cells morphology

The 2D, 3D, and laplacian 5×5 images (Figure 54e, j, h) show the disturbances and alterations in *A. baumannii* ATCC 19606 cells after exposing to 0.5 MIC of AWME3 (0.19 mg/mL). Bacterial cells appeared elongated, long bacilli, without septum (Figure 54e), 3D, and laplacian 5×5 images of AFM show cell walls and membrane were wrinkled, rough, multiple cleavages and splits were obvious in many locations of the cell walls (black and blue arrows) (Figure 54g, h). Lysed and flatten cells were obvious (green arrows and circles) as shown in Figure (54g, h). Bacterial cells dimensions (length, width), height, roughness, RMS, and shape indexes (Ska, Ss) were determined and measured after treatment with 0.19 mg/mL of AWME3 against planktonic *A. baumannii* cells ATCC 19606 (Table 27, Figure 55). *A. baumannii* ATCC 19606 cell length was significant increased ($p=0.0067$) to be 2.7 ± 1.4 μm compared to the untreated bacterial cells, which recorded 2.18 ± 0.32 μm (Table 27, Figure 55A), while a great significant decrease ($p<0.0001$) in the cell width to be 0.93 ± 0.18 μm compared to the control group, which was 1.15 ± 0.19 μm (Figure 55B). Sharply decrease was obvious in the height (471.2 ± 108.6 nm of treated *A. baumannii* ATCC 19606 cells with 0.5 MIC of AWME3, and significant statistical difference ($p<0.0001$) was obvious compared to untreated cells (776.6 ± 128.3 nm) (Table 27, Figure 54b, f, and Figure 55C). Shrinkage with 40% in the cell height of *A. baumannii* ATCC 19606 strain induced when it was exposed to 0.5 MIC of AWME3. The bacterial surface roughness values as a function of AWME3 treatment at 0.5 MIC were quantified for *A. baumannii* ATCC 19606 strain. Investigation of AFM captured height images at 2D and 3D indicated that exposure of MDR-*A. baumannii* cells to AWME3 at 0.5 MIC, irrespective of exposure time (12 h), increased the surface roughness significantly ($p < 0.001$) of cells to be 49.2 ± 18.9 nm, which was 2.47 folds greater than their corresponding control (19.9 ± 5.6 nm) (Table 27, Figure 55D). RMS roughness of the cell surface increased significantly ($p<0.0001$) to be 143.08 ± 35.6 nm when *A. baumannii* ATCC 19606 subjected to 0.5 MIC of AWME3 compared to the control group (102.8 ± 18.5 nm) (Table 27 and Figure 55E). The average of Ska and Ssk values of treated *A. baumannii* ATCC 19606 increased significantly ($p=0.012$, $p=0.016$) to be (8.37 ± 4.2 , 2.29 ± 0.69) compared to the control groups, which recorded 4.12 ± 2.9 and 1.17 ± 0.56 , respectively (Table 27, Figure 55F, G).

7.13.8. Effect of high AWME3 concentrations on the *A. baumannii* ATCC 19606 cells morphology

Extensive alterations and disturbances were detected in *A. baumannii* ATCC 19606 cells after exposing to MIC (0.38 mg/mL) and 2 MIC (0.75 mg/mL) of AWME3 (Figure 54i, k, l, m, o, p) for 20, and 10 minutes, respectively. Bacterial cells became shorter and rough with irregular septum compared with the untreated cells. Exposing to MIC (0.38 mg/mL) of AWME3 for 20 minutes caused several changes in cell walls and membranes of *A. baumannii* ATCC 19606, where cell walls were degraded, damaged, severe cleavages, splits, pores, and serious swelling were formed on the surface of the cells (blue arrows, green circle) (Figure 54i, k). Figure (54l) shows complete degradation and ruptured of cell walls, while cell membrane appeared injured and cleaved in multiple locations (black arrows), and collapsed in several cells.

The cell length of treated *A. baumannii* ATCC 19606 strain decreased lower ($2.08 \pm 0.6 \mu\text{m}$) without significant ($p=0.91$) statistical difference compared to the untreated bacteria ($2.18 \pm 0.32 \mu\text{m}$), while cell width was significantly ($p < 0.0001$) decreased to record $0.82 \pm 0.21 \mu\text{m}$, corresponding to their control cells ($1.15 \pm 0.19 \mu\text{m}$) (Table 27, Figure 55A, B). The average of height index was sharply decreased with great statistical difference ($p < 0.0001$) to be $383 \pm 81.1 \text{ nm}$, compared to the untreated cells ($776.6 \pm 128.3 \text{ nm}$), this led to high shrinkage (51%) in the cell height (Table 27, Figure 54k, Figure 55C). Roughness parameters (R_a , RMS) were calculated and measured (Table 27, Figure 55D, E), where the roughness of surface increased significantly ($p < 0.0001$) to reach to $56.4 \pm 13.8 \text{ nm}$, 2.8 fold greater than untreated bacteria ($19.9 \pm 5.6 \text{ nm}$). RMS index of *A. baumannii* ATCC 19606 ($109.8 \pm 16 \text{ nm}$) showed no statistical difference ($p=0.32$), when it was treated with MIC (0.38 mg/mL) of AWME3, compared to the control groups which recorded $102.8 \pm 18.5 \text{ nm}$. Shape parameters (S_{ka} , S_{sk}) of *A. baumannii* ATCC 19606 were increased significantly ($p=0.001$, $p=0.02$) to be 11.9 ± 6.4 and 2.9 ± 0.87 , respectively, compared to the control group which recorded 4.12 ± 2.9 , and 1.17 ± 0.56 , respectively.

Great changes, and irregular shapes were formed when *A. baumannii* ATCC 19606 subjected to the highest concentration 2 MIC (0.75 mg/mL) for short period (10 min) as shown in topographic 2D and 3D images (Figure 54m, o, p). *A. baumannii* ATCC 19606 cells morphology was severely influenced because of AWME3 action after 10 minutes, where most of cells lost their cell walls, cell membranes, and in some cases, cells were without septum, became more swelling, blebbing, and disintegrated. Figure (54m) shows a great amount of cell debris was formed in irregular shapes around disrupted cells, where the initial reaction expected to be the leakage of a large amount of fluid from the partially disintegrated cells. The cytoplasmic fluid was leaked out from the inner membrane of the cell. This could prove that the AWME3 caused damage to the bacterial inner membrane.

When exposed to high AWME3 concentration of 0.75 mg/mL, a large amount of cytoplasmic fluid exerted outside from the bacteria. These bacteria appear either severely damaged or their

membrane fully collapsed and ghost cells with unclear and irregular dimensions were formed (Figure 54m, o, p). This indicates drastic permeabilisation of the inner membrane. Bacterial cell dimensions of *A. baumannii* ATCC 19606 length, width, height were evaluated, where high significant decrease ($p=0.0019$, $p<0.0001$) was obvious to be $1.59\pm0.67\ \mu\text{m}$, and $0.79\pm0.34\ \mu\text{m}$, respectively compared to their corresponding control groups ($2.18\pm0.32\ \mu\text{m}$, $1.15\pm0.19\ \mu\text{m}$) (Table 27, Figure 55A, B). High rate reduction in the height ($162.4\pm75.4\ \text{nm}$) of *A. baumannii* ATCC 19606 cells, that displayed high significant difference ($p<0.0001$), compared to untreated cells ($776.6\pm128.3\ \text{nm}$) (Table 27, Figure 55C). High rate shrinkage in the cell height (88%) of *A. baumannii* ATCC 19606 was obvious after exposing to 2 MIC of AWME3 for 10 minutes. The Ra and RMS indexes for treated *A. baumannii* ATCC 19606 strain displayed no significant differences ($p=0.3$, $p=0.19$) to be $14.4\pm4.4\ \text{nm}$, $104.1\pm40.2\ \text{nm}$, respectively, when compared to untreated bacteria ($19.9\pm5.6\ \text{nm}$, $126.4\pm22.6\ \text{nm}$) (Table 27, Figure 55D, E). Ska and Ssk was characterized for the cell shape of *A. baumannii* ATCC 19606, where both parameters did not show statistical difference ($p=0.55$, $p=0.13$) to record 6.7 ± 3.8 , 1.59 ± 0.66 , respectively, compared to control groups (4.12 ± 2.9 , 1.17 ± 0.56), respectively (Table 27, Figure 55F, G).

In summary, based on our study the mechanism of AWME3 FAs action on Gram-negative and Gram-positive bacteria can be proposed as complex time-dependent process, which can be divided into three stages. In the initial stage, AWME3 damage the bacterial outer membrane, which is mainly composed of LPS, causing the formation of LPS micelles in Gram-negative bacteria or peptidoglycan in Gram-positive bacteria strain. The indentations, graves, pores, and pitches on the cells as well as the debris and small amount of fluid found around the cells suggest that the outer membrane of LPS or peptidoglycan wall structures were affected by the action of FAs that are the most abundant in AWME3. In addition, the FAs tail react with the outer surface protein anchored on the outer membrane, while the FAs head are arranged in a circle around the bacterial cell forming shape like liposome that prevents the cell nutrients uptake, and blocks the electron transport chain. In the second stage, permeabilisation and dissociation of the inner membrane was initiated, where FAs are effective in killing bacteria at low pH ($\text{pH}\leq 5.5$). Therefore, the acidic group in FAs is essential for protonophore effect, and the negative group COO^- is ionised at low pH, which can release the proton H^+ and this will effect on the cell osmosis leading to increase the cell membrane fluidity and electron transport chain disruption. The drop in pH inside the cell effect on the cell survival via blocking enzymes mechanistic, where numerous enzymatic processes are pH dependent [67]. This may lead to uncoupling of the respiratory chain and disrupting the membrane associated process leading to cell wall division defects as observed by all microscopy techniques [92,98,131,133,391] leading to the leakage of cytoplasmic and genetic material, which were detected and confirmed at 260 nm, and 280 nm [131]. Furthermore, membrane damage resulted in large losses of cytoplasmic fluid. Being devoid of intracellular fluid and organelles, the cell architectural support was compromised and hence the bacteria

collapsed. In the third stage, the cell membranes were disintegrated, leaving behind massive amounts of membrane residues or debris. Only bacteria exposed to high concentrations of AWME3 showed the characteristics of the last stage [95].

MAIN RESULTS AND CONCLUSIONS

The main results and conclusion of this study can be formulated as following:

1. Series of organic solvents used to dissolve *H. illucens* larvae fat, where the larval fat dissolved completely in non-polar solvents (CCl₄, C₆H₁₄, CH₂Cl₂, CHCl₃, DMFA, C₅H₁₁OH CH₃CN, CHCl₃+DMFA, C₆H₁₄+C₃H₆O, DMSO + CH₃CN, CHCl₃ + CH₃CN, CHCl₃ + C₃H₆O, C₅H₁₁OH + DMSO), but hydrophobicity increased with water ratio (10-30%).
2. For the first time, extraction solution was discovered to extract bioactive compounds from the lipid part of *H. illucens* larvae, which composed of water: methanol: hydrochloric acid with ratio (90: 9: 1% v/v) (AWM).
3. A new protocol was developed to extract bioactive compounds in dispersive systems based on BSFL fat, where biologically active molecules were isolated from the oil layer and the produced compounds were dispersive in emulsion solution.
4. FFAs and their derivatives were released from BSFL fat after treatment with AWM solution during the sequential extraction, FFAs were the most abundant in (AWME1, AWME2, AWME3) with yield 4.33%, where SFAs decreased gradually to record 59.2%, 51.09%, and 51.32%, respectively, while USFAs increased gradually (26.05%, 27.42%, and 29.64%), respectively.
5. The percentages of *cis*-oleic acid (C18:1) and glycerol (C3:0) increased during the sequential extraction to be (22.65%, 23.9%, 26.28%), (0%, 3.47%, 7.87%) against AWME1, AWME2, and AWME3, respectively. This method may be applicable in industry to enhance and enrich the percentages of very important biomolecules (oleic acid, glycerol), which used in many pharmaceutical and industrial approaches.
6. The third extract AWME3 was the most potent among other extracts (AWME1, AWME2).
7. The AWMEs could inhibit and eradicate the most five important phytopathogenic bacteria (*Pantoea agglomerans* ATCC 27995, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 13951, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ATCC 15713, *Pectobacterium atrosepticum* ATCC BAA-672D, *Dickeya solani* NCBI IPO 2222) with MIC (0.78 mg/mL), MIC₅₀ (0.366 – 0.485 mg/ml), and MBC (0.78-1.56 mg/mL).
8. AWME3 extract inhibited and eradicated the MDR fish pathogenic bacteria (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*), where MIC was (0.095, 0.38 mg/mL), MIC₅₀ (0.064 – 0.22 mg/ml), and MBC (0.19, 0.38 mg/mL) against *A. hydrophila* and *A. salmonicida*, respectively.
9. AWME3 extract inhibited and eradicated the MDR human pathogenic bacteria (*K. pneumoniae* KP11627, *K. pneumoniae* KPM9, *S. aureus*, *A. baumannii* ATCC 19606), and XDR *K.*

pneumoniae ATCC BAA-273 with MIC (0.19-0.25 mg/mL), MIC₅₀ (0.147 – 0.22 mg/ml), and MBC (0.25-0.38 mg/mL).

10. All human MDR or XDR pathogenic bacteria strains did not induce any resistance against AWME3, while extensive resistance was induced against antibiotic (P/S, Ch), furthermore the AWME3 was safe for human HEK-293 cells with IC₅₀ 266.1 µg/mL, while bactericidal for all bacteria strains at the same concentration.
11. AWME3 extract inhibited and eradicated the strong biofilm (OD₅₇₀>0.3) formed by *K. pneumoniae* strains after 24 h at 0.5 mg/mL, furthermore it eradicated the mature biofilm (OD₅₇₀>0.1.5) formed by *K. pneumoniae* strains after 72h at 1.0 mg/mL, compared to the reference antibiotic (Dox), which could not inhibit or eradicate the mature biofilm at 4 mg/mL. The sub-MIC (0.125 mg/ml) of AWME3 shows a great significant effect against virulence factors of hvKp strains such as mucoviscosity, which was reduced and eliminated 100%. Rudimentary motility especially twitching motility of hvKp strains was significantly reduced with 50%, compared to control group. The mechanism of AWME3 action against hvKp biofilms confirmed via cell membrane permeability, which increased significantly >50% and >70% after exposing to MIC (0.25 mg/ml) and 2 MIC (0.5 mg/ml) of AWME3. Alterations in cell morphology, dispersed biofilms, cell debris and cell lysis of hvKp strains caused by AWME3 were visualized by SEM. Furthermore, reduction in cell survivals, and PI intensity (>40%) of mature biofilm investigated using fluorescence microscopy after AWME3 treatments.
12. Killing time of AWME3 against *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 strains was 5 and 10 min after treatment with 4 MIC, while it recorded 12 h and 24 h, respectively when these strains subjected to 4 MIC of antibiotic (P/S).
13. The mechanism of action of AWME3 was studied on Gram-positive (*S. aureus* ATCC 55804) and Gram- negative (*A. baumannii* ATCC 19606) bacteria. It was clarified through several steps including: cell membrane permeability, rigidity, and osmosity, pore formation, cytoplasmic content leakage, electron transport chain and nutrient uptake impairment, then cell wall degradation followed by cell death, all of these confirmed using several assays (Almar blue, bacteriolysis (killing time, growth curve kinetics), intracellular ATP, relative conductivity, cytoplasmic and genetic contents leakage at 260, 280 nm, respectively, and salt tolerance. Alteration in cell morphology, cell compartments, and cell dimension were visualised via microscopy techniques (SEM, TEM, AFM).

The data obtained in the work allow us to draw the following conclusions:

New extraction solution composed of acidic water methanol was discovered to extract bioactive molecules from HI larvae fat; the new developed methodology for sequential extraction enhanced and increased the amount of isolated FFAs and glycerol. Cis-oleic acid and glycerol increased significantly during the cascade extraction of HI larvae fat, thus AWME3 has the most potential activity among other extracts, furthermore the cascade extraction increased the yield extract of AWMEs during the three cycles of extraction.

The activity of AWMEs was evaluated against phytopathogenic bacteria; the biocidal activity of AWMEs eliminated the most important five phytopathogenic bacteria, including *Pantoea agglomerans* ATCC 27995, *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* ATCC 13951, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ATCC 15713, *Pectobacterium atrosepticum* ATCC BAA-672D, *Dickeya solani* NCBI IPO 2222 at dose dependant manner.

The antimicrobial properties of the three sequential extracts AWME1, AWME2, and AWME3 validated against MDR pathogenic fish bacteria, AWME3 pronounced to be the most effective one against *A. hydrophila* and *A. slamoncida*, further AWME3 efficiently eradicated the hypermucoviscous MDR clinical isolate *K. pneumoniae* KPi1627, environmental isolate *K. pneumoniae* KPM9, and the XDR standard carbapenem resistant NDM1- *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473. In addition, MDR human pathogenic bacteria did not generate any resistance to WME3 at low concentrations during several passages; further AWME3 was safe for HEK-293, while it was lethal for all tested bacteria strains. AWME3 eradicated single, mixed, and mature biofilms formed by the three strains of *K. pneumoniae* at low doses.

The mechanism of antibacterial action of AWME3 demonstrated that AWME3 causing bacteriolysis of *A. baumannii* ATCC 19606 and *S. aureus* ATCC 55804 after treatment in short periods. Biological assays and microscopy techniques demonstrated that the mod of AWME3 action goes through several mechanistique routes, where AWME3 binds to the LPS of the cell membrane to increase the permeability, rigidity, and osmosity, leading to pore formation, followed by cytoplasmic content leakage, electron transport chain and nutrient uptake impairment, then cell wall degradation followed by cell death.

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

HI -	<i>Hermetia illucens</i>
BSFL-	Black soldier fly larvae
AWM	Acidic water methanol
AWME	Acidic water methanol extract
MDR	Multidrug resistant
XDR	Extensive drug resistant
PDR	Pandrug resistant
FAs	Fatty acids
FFAs	Free fatty acids
SFAs	Saturated fatty acids
USFAs	Unsaturated fatty acids
PUFAs	Poly unsaturated fatty acids
SEM	Scanning electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
AFM	Atomic force microscopy
HEK-293 cells	Human embryonic kidney 293 cells
MIC	Minimum inhibitory concentration
MBC	Minimum bactericidal concentration
MBIC	Minimum biofilm inhibitory concentration
MBEC	Minimum biofilm eradication concentration
MIC50, IC50	50% of the minimum inhibitory concentration
IZD	Inhibition zone diameter
LB	Luria-Bertani
MH	Muller-Hinton
KPi1627	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPi1627
KPM9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPM9
KP ATCC BAA-2473	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-2473
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
EPA	Eicosapentaenoic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
TAGs	Triacylglycerols
GPLs	Glycerophospholipids
PBPs	Penicillin-binding proteins
GML	Glycerol monolaurate
FDA	Food and Drug Administration
LA	Lauric acid
ALA	Alpha linoleic acid
MRSA	Methicillin resistant <i>S. aureus</i>
ATP	Adenosine triphosphate
GTase	Glucosyltransferase
Hla	Alpha-haemolysin
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamases
<i>bla</i> gene	Beta-lactam gene
<i>tet</i> gene	Tetracycline gene
AheABC	<i>Aeromonas hydrophila</i> efflux ABC
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter sp</i>
NDM-1	New Delhi Metallo- β -lactamase-1
WHO	World health organization

hvKp	Hypervirulent <i>K. pneumoniae</i>
ATCC	American Type Culture Collection
PBS	Phosphate buffer saline
CV	Crystal violet
PI	Propidium iodide,
EtBr	Ethidium bromide
TSA	Tryptone soy agar
Pagg	<i>Pantoea agglomerans</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> subsp. <i>campestris</i>
Pbc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
Pba	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
Dsol	<i>Dickeya solani</i>
REC	Relative electric conductivity
OD	Optical density
BF	Biofilm formation
Dox	Doxycycline
P/S	Penicillin-streptomycin
NIST	National of institute standard and technology
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ANOVA	Analysis of variance
SD	Standard deviation
ECVs	Epidemiological Cut-off Values
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
SE	Sequential extraction
SEs	Sequential extracts
AB	Almar blue
NA	Nutrient agar
N. CT	Negative control
Abs	Absorbance
WHO	World Health Organization
Ra	Roughness average
Ska	Kurtosis average
Ssk	Surface skewness
RMS	Root mean square of surfaces

ACKNOWLEDGEMENTS

First, all thanks and blessing for Allah who guides, aid, and bless me in everything and everywhere in my life.

My deepest gratitude and sincere appreciations to my scientific supervisor Dr. Elena Ivanovna Marusich, PhD, Deputy head of Laboratory of Innovative drug Development and Agro-biotechnology, Phystech School of Biological and Medical Physics, Department of Innovative Pharmaceutics, Medical Equipment and Biotechnology, MIPT University, Moscow, Russia for her guidance, vital instructions, cooperation, and encouragement during these studies. I express my gratitude to Dr. Sergey Victorovich Leonov, MD, Head of Laboratory of Innovative Drug Development and Agro-biotechnology, Department of Innovative Pharmaceutics, Medical Equipment and Biotechnology, MIPT University for his advising and supporting during this study. All thanks for Dr. Denis Kuzmin, the Director of Phystech School of Biological and Medical Physics at MIPT (Moscow, Russia) for this project support.

All thanks to Dr. Konstantin Balakin, Dr. Chem. Sci, Scientific consultant of Department of Innovative Pharmaceutics, Medical Equipment and Biotechnology, MIPT University, Russia for his valuable comments, constructive criticism during the entire period of this work. I would like to thank Dr. Alexy Kokcin, PhD Department of Computational Condensed Matter Physics, MIPT University for helping me during AFM analysis. All thanks to Dr. Andrey Drozdov, PhD, senior researcher in Laboratory of Nano-biotechnology for his cooperation and help during SEM analysis. All thanks to Dr. Elena Alexandrovna Gushina, D.I. Ivanovsky, Institute of Virology, Moscow, Russia for her assisting in TEM analysis.

I owe great support, sincere love and my deepest thanks to my family, mother, father, my brothers, and my lovest wife, who stood by me during hard times and who gave me all the potential support to accomplish this study, and my lovely kids Amr and Yousof.

References

1. Aguilar-Marcelino, L.; Mendoza-de-Gives, P.; Al-Ani, L.K.T.; López-Arellano, M.E.; Gómez-Rodríguez, O.; Villar-Luna, E.; Reyes-Guerrero, D.E. Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. In *Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture*; Sharma, V., Salwan, R., Al-Ani, L.K.T., Eds.; Academic Press Inc.: London, United Kingdom, 2020; pp. 333–349 ISBN 9780128184691.
2. Erkinharju, T.; Dalmo, R.A.; Hansen, M.; Seternes, T. Cleaner fish in aquaculture: review on diseases and vaccination. *Rev. Aquac.* **2021**, *13*, 189–237, doi:10.1111/raq.12470.
3. Opiyo, M.A.; Marijani, E.; Muendo, P.; Odede, R.; Leschen, W.; Charo-Karisa, H. A review of aquaculture production and health management practices of farmed fish in Kenya. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **2018**, *6*, 141–148, doi:10.1016/J.IJVSM.2018.07.001.
4. Nimer, N.A. Nosocomial infection and antibiotic-resistant threat in the Middle East. **2022**, *15*, 631–639, doi:10.2147/IDR.S351755.
5. Lautenbach, E.; Abrutyn, E. Healthcare-acquired bacterial infections. In *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*; Philip S. Brachman, Abrutyn, E., Eds.; Springer, New York, NY, 2009; pp. 543–575 ISBN 9780387098425.
6. Algammal, A.M.; El-Sayed, M.E.; Youssef, F.M.; Saad, S.A.; Elhaig, M.M.; Batiha, G.E.; Hozzein, W.N.; Ghobashy, M.O.I. Prevalence, the antibiogram and the frequency of virulence genes of the most predominant bacterial pathogens incriminated in calf pneumonia. *AMB Express* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1186/s13568-020-01037-z.
7. Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
8. Jackman, J.A.; Yoon, B.K.; Li, D.; Cho, N.J. Nanotechnology formulations for antibacterial free fatty acids and monoglycerides. *Molecules* **2016**, *21*, 1–19, doi:10.3390/molecules21030305.
9. Thormar, H.; Hilmarsson, H. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *150*, 1–11, doi:10.1016/j.chemphyslip.2007.06.220.
10. Casillas-Vargas, G.; Ocasio-Malavé, C.; Medina, S.; Morales-Guzmán, C.; Del Valle, R.G.; Carballeira, N.M.; Sanabria-Ríos, D.J. Antibacterial fatty acids: An update of possible

mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Prog. Lipid Res.* **2021**, *82*, 1–10, doi:10.1016/j.plipres.2021.101093.

11. ITIS - Report: *Hermetia illucens* Available online: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=130298#null (accessed on Apr 7, 2022).
12. Bonelli, M.; Bruno, D.; Brilli, M.; Gianfranceschi, N.; Tian, L.; Tettamanti, G.; Caccia, S.; Casartelli, M. Black soldier fly larvae adapt to different food substrates through morphological and functional responses of the midgut. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–27, doi:10.3390/ijms21144955.
13. Bruno, D.; Bonelli, M.; De Filippis, F.; Di Lelio, I.; Tettamanti, G.; Casartelli, M.; Ercolini, D.; Caccia, S. The intestinal microbiota of *Hermetia illucens* larvae is affected by diet and shows a diverse composition in the different midgut regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, 1–14, doi:10.1128/AEM.01864-18.
14. De Smet, J.; Wynants, E.; Cos, P.; Van Campenhout, L. Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and impact on exploitation potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, 1–17, doi:10.1128/AEM.02722-17.
15. Bertinetti, C.; Samayoa, A.C.; Hwang, S.Y. Effects of feeding adults of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) on longevity, oviposition, and egg hatchability: Insights into optimizing egg production. *J. Insect Sci.* **2019**, *19*, 1–7, doi:10.1093/jisesa/iez001.
16. Sheppard, D.C.; Tomberlin, J.K.; Joyce, J.A.; Kiser, B.C.; Sumner, S.M. Rearing methods for the black soldier fly (diptera: *Stratiomyidae*). *J. Med. Entomol.* **2002**, *39*, 695–698, doi:10.1603/0022-2585-39.4.695.
17. Tomberlin, J.K.; Sheppard, D.C.; Joyce, J.A. Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: *Stratiomyidae*) reared on three artificial diets. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2002**, *95*, 379–386, doi:10.1603/0013-8746(2002)095[0379:SLHTOB]2.0.CO;2.
18. Spranghers, T.; Ottoboni, M.; Klootwijk, C.; Owyn, A.; Deboosere, S.; De Meulenaer, B.; Michiels, J.; Eeckhout, M.; De Clercq, P.; De Smet, S. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2594–2600, doi:10.1002/jsfa.8081.
19. Tomberlin, J.K.; Sheppard, D.C.; Joyce, J.A. Susceptibility of black soldier fly (Diptera: *Stratiomyidae*) larvae and adults to four insecticides. *J. Econ. Entomol.* **2002**, *95*, 598–602,

doi:10.1603/0022-0493-95.3.598.

20. Holmes, L.A.; VanLaerhoven, S.L.; Tomberlin, J.K. Lower temperature threshold of black soldier fly (Diptera: *Stratiomyidae*) development. *J. Insects as Food Feed* **2016**, *2*, 255–262, doi:10.3920/JIFF2016.0008.
21. Nakamura, S.; Ichiki, R.T.; Shimoda, M.; Morioka, S. Small-scale rearing of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: *Stratiomyidae*), in the laboratory: low-cost and year-round rearing. *Appl. Entomol. Zool.* **2016**, *51*, 161–166, doi:10.1007/s13355-015-0376-1.
22. Van Huis, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annu. Rev. Entomol.* **2013**, *58*, 563–583, doi:10.1146/annurev-ento-120811-153704.
23. Lalander, C.; Diener, S.; Zurbrugg, C.; Vinnerås, B. Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). *J. Clean. Prod.* **2019**, *208*, 211–219, doi:10.1016/j.jclepro.2018.10.017.
24. Meneguz, M.; Schiavone, A.; Gai, F.; Dama, A.; Lussiana, C.; Renna, M.; Gasco, L. Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 5776–5784, doi:10.1002/jsfa.9127.
25. Barragan-Fonseca, K.B.; Dicke, M.; van Loon, J.J.A. Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed - a review. *J. Insects as Food Feed* **2017**, *3*, 105–120, doi:10.3920/JIFF2016.0055.
26. Schiavone, A.; Dabbou, S.; De Marco, M.; Cullere, M.; Biasato, I.; Biasibetti, E.; Capucchio, M.T.; Bergagna, S.; Dezzutto, D.; Meneguz, M.; et al. Black soldier fly larva fat inclusion in finisher broiler chicken diet as an alternative fat source. *Animal* **2018**, *12*, 2032–2039, doi:10.1017/S1751731117003743.
27. St-Hilaire, S.; Cranfill, K.; McGuire, M.A.; Mosley, E.E.; Tomberlin, J.K.; Newton, L.; Sealey, W.; Sheppard, C.; Irving, S. Fish offal recycling by the black soldier fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids. *J. World Aquac. Soc.* **2007**, *38*, 309–313, doi:10.1111/j.1749-7345.2007.00101.x.
28. Bessa, L.W.; Pieterse, E.; Marais, J.; Hoffman, L.C. Why for feed and not for human consumption? The black soldier fly larvae. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 2747–2763, doi:10.1111/1541-4337.12609.
29. Barroso, F.G.; Sánchez-Muros, M.J.; Segura, M.; Morote, E.; Torres, A.; Ramos, R.; Guil, J.L.

- Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *62*, 8–13, doi:10.1016/j.jfca.2017.04.008.
30. Agoramoorthy, G.; Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V.; Hsu, M.J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian J. Microbiol.* **2007**, *38*, 739–742, doi:10.1590/S1517-83822007000400028.
 31. Marusich, E.; Mohamed, H.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Fatty acids from *Hermetia illucens* larvae fat inhibit the proliferation and growth of actual phytopathogens. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1–21, doi:10.3390/microorganisms8091423.
 32. Liland, N.S.; Biancarosa, I.; Araujo, P.; Biemans, D.; Bruckner, C.G.; Waagbø, R.; Torstensen, B.E.; Lock, E.-J.J. Modulation of nutrient composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–23, doi:10.1371/journal.pone.0183188.
 33. Barroso, F.G.; Sánchez-Muros, M.J.; Segura, M.; Morote, E.; Torres, A.; Ramos, R.; Guil, J.L. Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *62*, 8–13, doi:10.1016/j.jfca.2017.04.008.
 34. Ramos-Bueno, R.P.; González-Fernández, M.J.; Sánchez-Muros-Lozano, M.J.; García-Barroso, F.; Guil-Guerrero, J.L. Fatty acid profiles and cholesterol content of seven insect species assessed by several extraction systems. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 1471–1477, doi:10.1007/s00217-016-2647-7.
 35. Sivakumar, R.; Jebanesan, A.; Govindarajan, M.; Rajasekar, P. Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2011**, *4*, 706–710, doi:10.1016/S1995-7645(11)60178-8.
 36. Choi, W.H.; Jiang, M. Evaluation of antibacterial activity of hexanedioic acid isolated from *Hermetia illucens* larvae. *J. Appl. Biomed.* **2014**, *12*, 179–189, doi:10.1016/j.jab.2014.01.003.
 37. Caligiani, A.; Marseglia, A.; Sorci, A.; Bonzanini, F.; Lolli, V.; Maistrello, L.; Sforza, S. Influence of the killing method of the black soldier fly on its lipid composition. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 276–282, doi:10.1016/j.foodres.2018.08.033.
 38. Turker, H.; Yildirim, A.B.; Karakaş, F.P. Sensitivity of bacteria isolated from fish to some medicinal plants. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* **2009**, *9*, 181–186, doi:10.4194/trjfas.2009.0209.
 39. Codjoe, F.; Donkor, E. Carbapenem Resistance: A Review. *Med. Sci.* **2018**, *6*, 1–28, doi:10.3390/medsci6010001.

40. Sangduan, C. Skin care product containing *Hermetia illucens* extract. *Pat. Appl. Publ.* 2018, 1, 1–4.
41. Ravi, H.K.; Vian, M.A.; Tao, Y.; Degrou, A.; Costil, J.; Trespeuch, C.; Chemat, F. Alternative solvents for lipid extraction and their effect on protein quality in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Clean. Prod.* **2019**, *238*, 1–13, doi:10.1016/j.jclepro.2019.117861.
42. Makkar, H.P.S.; Tran, G.; Heuzé, V.; Ankers, P. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2014**, *197*, 1–33, doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008.
43. Nordøy, A.; Marchioli, R.; Arnesen, H.; Videbæk, J. N-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Lipids* **2001**, *36*, 127–129, doi:10.1007/s11745-001-0695-7.
44. Gómez Candela, C.; Bermejo López, L.M.; Loria Kohen, V. Importancia del equilibrio del índice omega-6/omega-3 en el mantenimiento de un buen estado de salud. recomendaciones nutricionales. *Nutr. Hosp.* **2011**, *26*, 323–329, doi:10.3305/nh.2011.26.2.5117.
45. Ushakova, N.A.; Brodskii, E.S.; Kovalenko, A.A.; Bastrakov, A.I.; Kozlova, A.A.; Pavlov, D.S. Characteristics of lipid fractions of larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2016**, *468*, 209–212, doi:10.1134/S1607672916030145.
46. Zarantoniello, M.; Zimbelli, A.; Randazzo, B.; Compagni, M.D.; Truzzi, C.; Antonucci, M.; Riolo, P.; Loreto, N.; Osimani, A.; Milanović, V.; et al. Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) reared on roasted coffee by-product and *Schizochytrium* sp. as a sustainable terrestrial ingredient for aquafeeds production. *Aquaculture* **2020**, *518*, 1–15, doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734659.
47. Arrese, E.L.; Soulages, J.L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol.* **2010**, *55*, 207–225, doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356.
48. Visser, B.; Willett, D.S.; Harvey, J.A.; Alborn, H.T. Concurrence in the ability for lipid synthesis between life stages in insects. *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 1–8, doi:10.1098/rsos.160815.
49. Malcicka, M.; Visser, B.; Ellers, J. An evolutionary perspective on linoleic acid synthesis in animals. *Evol. Biol.* **2018**, *45*, 15–26, doi:10.1007/s11692-017-9436-5.
50. Hoc, B.; Genva, M.; Fauconnier, M.L.; Lognay, G.; Francis, F.; Caparros Megido, R. About lipid metabolism in *Hermetia illucens* (L. 1758): on the origin of fatty acids in prepupae. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1038/s41598-020-68784-8.
51. Ewald, N.; Vidakovic, A.; Langeland, M.; Kiessling, A.; Sampels, S.; Lalander, C. Fatty acid composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) – Possibilities and limitations for

- modification through diet. *Waste Manag.* **2020**, *102*, 40–47, doi:10.1016/j.wasman.2019.10.014.
52. Li, W.; Li, M.; Zheng, L.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Yu, Z.; Ma, Z.; Li, Q. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid accumulation in black soldier fly. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 4–9, doi:10.1186/s13068-015-0306-z.
53. Liu, X.; Chen, X.; Wang, H.; Yang, Q.; Ur Rehman, K.; Li, W.; Cai, M.; Li, Q.; Mazza, L.; Zhang, J.; et al. Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–21, doi:10.1371/journal.pone.0182601.
54. Lange, K.W.; Nakamura, Y. Edible insects as future food: chances and challenges. *J. Futur. Foods* **2021**, *1*, 38–46, doi:10.1016/j.jfutfo.2021.10.001.
55. van Huis, A.; Oonincx, D.G.A.B. The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2017**, *37*, 1–14, doi:10.1007/s13593-017-0452-8.
56. Tvrzicka, E.; Kremmyda, L.S.; Stankova, B.; Zak, A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review, part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 117–130, doi:10.5507/bp.2011.038.
57. Lee, A.G. Lipid-protein interactions in biological membranes: A structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2003**, *1612*, 1–40, doi:10.1016/S0005-2736(03)00056-7.
58. Anthony, R.; Stuart, B. Solvent extraction and characterization of neutral lipids in *Oocystis* sp. *Front. Energy Res.* **2015**, *3*, 1–5, doi:10.3389/fenrg.2014.00064.
59. Müller, A.; Wolf, D.; Gutzeit, H.O. The black soldier fly, *Hermetia illucens* - a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2017**, *72*, 351–363, doi:10.1515/znc-2017-0030.
60. Stan, D.; Enciu, A.M.; Mateescu, A.L.; Ion, A.C.; Brezeanu, A.C.; Stan, D.; Tanase, C. Natural compounds with antimicrobial and antiviral effect and nanocarriers used for their transportation. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 1–25, doi:10.3389/fphar.2021.723233.
61. Saini, R.K.; Prasad, P.; Shang, X.; Keum, Y.S. Advances in lipid extraction methods—a review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–19, doi:10.3390/ijms222413643.
62. Kumar, R.R.; Rao, P.H.; Arumugam, M. Lipid extraction methods from microalgae: A comprehensive review. *Front. Energy Res.* **2015**, *2*, 1–9, doi:10.3389/fenrg.2014.00061.
63. Ravi, H.K.; Degrou, A.; Costil, J.; Trespeuch, C.; Chemat, F.; Vian, M.A. Larvae mediated valorization of industrial, agriculture and food wastes: Biorefinery concept through

- bioconversion, processes, procedures, and products. *Processes* **2020**, *8*, 1–40, doi:10.3390/PR8070857.
64. Laroche, M.; Perreault, V.; Marciniak, A.; Gravel, A.; Chamberland, J.; Doyen, A. Comparison of conventional and sustainable lipid extraction methods for the production of oil and protein isolate from edible insect meal. *Foods* **2019**, *8*, 1–11, doi:10.3390/foods8110572.
65. Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger principles of biochemistry*; 4 th.; New York : W.H. Freeman, 2017, P:1-1120; ISBN 9781319108243.
66. Franco, A.; Scieuzo, C.; Salvia, R.; Petrone, A.M.; Tafi, E.; Moretta, A.; Schmitt, E.; Falabella, P. Lipids from *Hermetia illucens*, an innovative and sustainable source. *Sustain.* **2021**, *13*, 1–23, doi:10.3390/su131810198.
67. Scrimgeour, C. Chemistry of fatty acids. In *Bailey's industrial oil and fat products*; Shamsi, I.H., Shamsi, B.H., Jiang, L., Eds.; John Wiley and Sons, Inc: New York, USA, 2005; Vol. 1, p. 44.
68. Hill, K. Fats and Oils as Oleochemical Raw Materials. *J. Oleo Sci.* **2001**, *50*, 433–444, doi:10.5650/jos.50.433.
69. Kowalska, D.; Gruczynska, E.; Kowalska, M. The effect of enzymatic interesterification on the physico-chemical properties and thermo-oxidative stabilities of beef tallow stearin and rapeseed oil blends. *J. Therm. Anal. Calorim. 2014 1201* **2014**, *120*, 507–517, doi:10.1007/S10973-014-3869-1.
70. Kowalska, M.; Woźniak, M.; Żbikowska, A.; Kozłowska, M. Physicochemical characterization and evaluation of emulsions containing chemically modified fats and different hydrocolloids. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1–17, doi:10.3390/biom10010115.
71. Kundu, P.; Agrawal, A.; Mateen, H.; Mishra, I.M. Stability of oil-in-water macro-emulsion with anionic surfactant: Effect of electrolytes and temperature. *Chem. Eng. Sci.* **2013**, *102*, 176–185, doi:10.1016/J.CES.2013.07.050.
72. Mohamed, H.; Marusich, E.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Fatty acids - enriched fractions of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) larvae fat can combat MDR pathogenic fish bacteria *Aeromonas spp.* *Int. J. Mol. Sci* **2021**, *22*, 1–27, doi:10.3390/ijms22168829.
73. Pati, S.; Nie, B.; Arnold, R.D.; Cummings, B.S. Extraction, chromatographic and mass spectrometric methods for lipid analysis. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30*, 695–709, doi:10.1002/BMC.3683.

74. Chiu, H.H.; Kuo, C.H. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *J. Food Drug Anal.* **2020**, *28*, 60–73, doi:10.1016/j.jfda.2019.10.003.
75. Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 281–296, doi:10.1038/nrm.2017.138.
76. Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J.; Collins, J.J. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 423–435, doi:10.1038/nrmicro2333.
77. Gajdács, M.; Albericio, F. Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics* **2019**, *8*, 8–11, doi:10.3390/antibiotics8030129.
78. Iskandar, K.; Murugaiyan, J.; Halat, D.H.; Hage, S. El; Chibabhai, V.; Adukkadukkam, S.; Roques, C.; Molinier, L.; Salameh, P.; Van Dongen, M. Antibiotic discovery and resistance: The chase and the race. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–38, doi:10.3390/antibiotics11020182.
79. Dodds, D.R. Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *134*, 139–146, doi:10.1016/j.bcp.2016.12.005.
80. Fortman, J.L.; Mukhopadhyay, A. The future of antibiotics: emerging technologies and stewardship. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 515–517, doi:10.1016/j.tim.2016.04.003.
81. Zaman, S. Bin; Hussain, M.A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K.T.; Hossain, N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus* **2017**, *9*, 1–9, doi:10.7759/cureus.1403.
82. Economou, V.; Gousia, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* **2015**, *8*, 49–61, doi:10.2147/IDR.S55778.
83. MacGowan, A.; Macnaughton, E. Antibiotic resistance. *Med. (United Kingdom)* **2017**, *45*, 622–628, doi:10.1016/j.mpmed.2017.07.006.
84. Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 464–472, doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015.
85. Uddin, T.M.; Chakraborty, A.J.; Khusro, A.; Zidan, B.R.M.; Mitra, S.; Emran, T. Bin; Dhama, K.; Ripon, M.K.H.; Gajdács, M.; Sahibzada, M.U.K.; et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J. Infect. Public Health* **2021**, *14*, 1750–1766, doi:10.1016/j.jiph.2021.10.020.
86. C Reygaert, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 482–501, doi:10.3934/microbiol.2018.3.482.

87. Blair, J.M.A.; Webber, M.A.; Baylay, A.J.; Ogbolu, D.O.; Piddock, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 42–51, doi:10.1038/nrmicro3380.
88. Grossman, T.H. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, 1–24, doi:10.1101/cshperspect.a025387.
89. Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **2017**, *33*, 300–305, doi:10.4103/JOACP.JOACP_349_15.
90. Bush, K.; Bradford, P.A. β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. **2016**, *6*, 1–22, doi:10.1101/cshperspect.a025247.
91. Foster, T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 430–449, doi:10.1093/femsre/fux007.
92. Shin, S.Y.; Bajpai, V.K.; Kim, H.R.; Kang, S.C. Antibacterial activity of eicosapentaenoic acid (EPA) against foodborne and food spoilage microorganisms. *LWT - Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 1515–1519, doi:10.1016/j.lwt.2006.12.005.
93. Hall, C.W.; Mah, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 276–301, doi:10.1093/femsre/fux010.
94. Fischer, C.L.; Drake, D.R.; Dawson, D. V.; Blanchette, D.R.; Brogden, K.A.; Wertz, P.W. Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1157–1161, doi:10.1128/AAC.05151-11.
95. Yoon, B.K.; Jackman, J.A.; Valle-González, E.R.; Cho, N.J. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1–40, doi:10.3390/ijms19041114.
96. Desbois, A.P.; Smith, V.J. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1629–1642, doi:10.1007/s00253-009-2355-3.
97. Hobby, C.R.; Herndon, J.L.; Morrow, C.A.; Peters, R.E.; Symes, S.J.K.; Giles, D.K. Exogenous fatty acids alter phospholipid composition, membrane permeability, capacity for biofilm formation, and antimicrobial peptide susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiologyopen* **2019**, *8*, 1–11, doi:10.1002/mbo3.635.
98. Hyldgaard, M.; Sutherland, D.S.; Sundh, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Antimicrobial mechanism

- of monocaprylate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2957–2965, doi:10.1128/AEM.07224-11.
99. Nakatsuji, T.; Kao, M.C.; Fang, J.Y.; Zouboulis, C.C.; Zhang, L.; Gallo, R.L.; Huang, C.M. Antimicrobial property of lauric acid against *propionibacterium acnes*: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *129*, 2480–2488, doi:10.1038/jid.2009.93.
 100. Schlievert, P.M.; Kilgore, S.H. Glycerol monolaurate contributes to the antimicrobial and anti-inflammatory activity of human milk. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–9, doi:10.1038/s41598-019-51130-y.
 101. Matsue, M.; Mori, Y.; Nagase, S.; Sugiyama, Y.; Hirano, R.; Ogai, K.; Ogura, K.; Kurihara, S.; Okamoto, S. Measuring the antimicrobial activity of lauric acid against various bacteria in human gut microbiota using a new method. *Cell Transplant.* **2019**, *28*, 1528–1541, doi:10.1177/0963689719881366.
 102. Nair, M.K.M.; Joy, J.; Vasudevan, P.; Hinckley, L.; Hoagland, T.A.; Venkitanarayanan, K.S. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 3488–3495, doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2.
 103. Thamphiwatana, S.; Gao, W.; Obonyo, M.; Zhang, L. In vivo treatment of *Helicobacter pylori* infection with liposomal linolenic acid reduces colonization and ameliorates inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 17600–17605, doi:10.1073/pnas.1418230111.
 104. Heerklotz, H. Interactions of surfactants with lipid membranes. *Q. Rev. Biophys.* **2008**, *41*, 205–264, doi:10.1017/S0033583508004721.
 105. Skřivanová, E.; Marounek, M.; Dlouhá, G.; Kaňka, J. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2-C18 fatty acids. *Lett. Appl. Microbiol.* **2005**, *41*, 77–81, doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01709.x.
 106. Bazinet, R.P.; Layé, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 771–785, doi:10.1038/nrn3820.
 107. Thormar, H.; Hilmarsen, H.; Bergsson, G. Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 522–526, doi:10.1128/AEM.72.1.522-526.2006.
 108. Sun, C.Q.; O'Connor, C.J.; Robertson, A.M. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2003**, *36*, 9–17, doi:10.1016/S0928-8244(03)00008-7.

109. Chen, X.; Zhao, X.; Deng, Y.; Bu, X.; Ye, H.; Guo, N. Antimicrobial potential of myristic acid against *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2019**, *72*, 298–305, doi:10.1038/s41429-019-0152-5.
110. Schlievert, P.M.; Peterson, M.L. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0040350.
111. Morikawa, T.; Yamamoto, Y.; Nonomura, Y. Effect of pH on bactericidal activities of calcium laurate. *J. Oleo Sci.* **2018**, *67*, 859–862, doi:10.5650/jos.ess17280.
112. Lee, S.E.; Lim, J.W.; Kim, J.M.; Kim, H. Anti-inflammatory mechanism of polyunsaturated fatty acids in *Helicobacter pylori* -infected gastric epithelial cells. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 1–12, doi:10.1155/2014/128919.
113. Jung, S.W.; Lee, S.W. The antibacterial effect of fatty acids on *Helicobacter pylori* infection. *Korean J. Intern. Med.* **2016**, *31*, 30–35, doi:10.3904/kjim.2016.31.1.30.
114. Correia, M.; Michel, V.; Matos, A.A.; Carvalho, P.; Oliveira, M.J.; Ferreira, R.M.; Dillies, M.A.; Huerre, M.; Seruca, R.; Figueiredo, C.; et al. Docosahexaenoic acid inhibits *Helicobacter pylori* growth in vitro and mice gastric mucosa colonization. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–9, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0035072.
115. Bergsson, G.; Arnfinnsson, J.; Steingrímsson, Ó.; Thormar, H. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *Apms* **2001**, *109*, 670–678, doi:10.1034/j.1600-0463.2001.d01-131.x.
116. Marounek, M.; Skřivanová, E.; Rada, V. Susceptibility of *Escherichia coli* to C2-C18 Fatty Acids. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2003**, *48*, 731–735, doi:10.1007/BF02931506.
117. Skřivanová, E.; Savka, O.G.; Marounek, M. In vitro effect of C2-C18 fatty acids on Salmonellas. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2004**, *49*, 199–202, doi:10.1007/BF02931402.
118. Kollanoor, A.; Vasudevan, P.; Nair, M.K.M.; Hoagland, T.; Venkitanarayanan, K. Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monocaprylin and sodium caprylate). *Aquac. Res.* **2007**, *38*, 1293–1300, doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01799.x.
119. Kim, S.A.; Rhee, M.S. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 6552–6560, doi:10.1128/AEM.02164-13.
120. Kim, S.A.; Rhee, M.S. Synergistic antimicrobial activity of caprylic acid in combination with

- citric acid against both *Escherichia coli* O157: H7 and indigenous microflora in carrot juice. *Food Microbiol.* **2015**, *49*, 166–172, doi:10.1016/j.fm.2015.02.009.
121. Kitahara, T.; Koyama, N.; Matsuda, J.; Aoyama, Y.; Hirakata, Y.; Kamihira, S.; Kohno, S.; Nakashima, M.; Sasaki, H. Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1321–1326, doi:10.1248/bpb.27.1321.
 122. Lin, M.H.; Hsu, T.L.; Lin, S.Y.; Pan, Y.J.; Jan, J.T.; Wang, J.T.; Khoo, K.H.; Wu, S.H. Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2613–2623, doi:10.1074/mcp.M900276-MCP200.
 123. Preuss, H.G.; Echard, B.; Dadgar, A.; Talpur, N.; Manohar, V.; Enig, M.; Bagchi, D.; Ingram, C. Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: In vitro and in vivo studies. *Toxicol. Mech. Methods* **2005**, *15*, 279–285, doi:10.1080/15376520590968833.
 124. Choi, M.J.; Kim, S.A.; Lee, N.Y.; Rhee, M.S. New decontamination method based on caprylic acid in combination with citric acid or vanillin for eliminating *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *166*, 499–507, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.016.
 125. Kim, S.A.; Rhee, M.S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157: H7. *Food Control* **2016**, *60*, 447–454, doi:10.1016/j.foodcont.2015.08.022.
 126. Hovorková, P.; Laloučková, K.; Skřivanová, E. Determination of in vitro antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. *Czech J. Anim. Sci.* **2018**, *63*, 119–125, doi:10.17221/70/2017-CJAS.
 127. Anacarso, I.; Quartieri, A.; De Leo, R.; Pulvirenti, A. Evaluation of the antimicrobial activity of a blend of monoglycerides against *Escherichia coli* and *Enterococci* with multiple drug resistance. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 85–89, doi:10.1007/s00203-017-1419-5.
 128. Fung, K.P.; Han, Q.B.; Ip, M.; Yang, X.S.; Lau, C.B.; Chan, B.C. Synergists from *Portulaca oleracea* with macrolides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and related mechanism. *Hong Kong Med. J. = Xianggang yi xue za zhi* **2017**, *23*, 38–42.
 129. Won, S.R.; Hong, M.J.; Kim, Y.M.; Li, C.Y.; Kim, J.W.; Rhee, H.I. Oleic acid: An efficient

- inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 4999–5002, doi:10.1016/j.febslet.2007.09.045.
130. Zhou, X.; Stevens, M.J.A.; Neuenschwander, S.; Schwarm, A.; Kreuzer, M.; Bratus-Neuenschwander, A.; Zeitz, J.O. The transcriptome response of the ruminal methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* strain M1 to the inhibitor lauric acid. *BMC Res. Notes* **2018**, *11*, 1–10, doi:10.1186/S13104-018-3242-8/TABLES/2.
131. Cartron, M.L.; England, S.R.; Chiriac, A.I.; Josten, M.; Turner, R.; Rauter, Y.; Hurd, A.; Sahl, H.G.; Jones, S.; Foster, S.J. Bactericidal activity of the human skin fatty acid cis-6-hexadecanoic acid on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3599–3609, doi:10.1128/AAC.01043-13.
132. Herndon, J.L.; Peters, R.E.; Hofer, R.N.; Simmons, T.B.; Symes, S.J.; Giles, D.K. Exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) promote changes in growth, phospholipid composition, membrane permeability and virulence phenotypes in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 1–12, doi:10.1186/s12866-020-01988-0.
133. Wang, J.; Ma, M.; Yang, J.; Chen, L.; Yu, P.; Wang, J.; Gong, D.; Deng, S.; Wen, X.; Zeng, Z. In vitro antibacterial activity and mechanism of monocaprylin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 1988–1996, doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-248.
134. Peters, J.S.; Chin, C.K. Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*, 117–124, doi:10.1016/S0981-9428(02)00014-1.
135. Zheng, C.J.; Yoo, J.S.; Lee, T.G.; Cho, H.Y.; Kim, Y.H.; Kim, W.G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5157–5162, doi:10.1016/j.febslet.2005.08.028.
136. Sado-Kamdem, S.L.; Vannini, L.; Guerzoni, M.E. Effect of alpha-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *129*, 288–294, doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.12.010.
137. Schönfeld, P.; Wojtczak, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 231–241, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.04.029.
138. Adolph, S.; Bach, S.; Blondel, M.; Cuff, A.; Moreau, M.; Pohnert, G.; Poulet, S.A.; Wichard, T.; Zuccaro, A. Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different

- phyla. *J. Exp. Biol.* **2004**, *207*, 2935–2946, doi:10.1242/jeb.01105.
139. Yaman, S.O.; Ayhanci, A. Lipid Peroxidation. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2021**, *47*, 759–764, doi:10.5772/INTECHOPEN.95802.
140. Ochońska, D.; Ścibik, Ł.; Brzywczy-Włoch, M. Biofilm formation of clinical *klebsiella pneumoniae* strains isolated from tracheostomy tubes and their association with antimicrobial resistance, virulence and genetic diversity. *Pathogens* **2021**, *10*, 1–15, doi:10.3390/pathogens10101345.
141. Flemming, H.C.; Wuertz, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 247–260, doi:10.1038/s41579-019-0158-9.
142. Bjarnsholt, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Suppl.* **2013**, *121*, 1–51, doi:10.1111/apm.12099.
143. Estrela, A.B.; Abraham, W.R. Combining biofilm-controlling compounds and antibiotics as a promising new way to control biofilm infections. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 1374–1393, doi:10.3390/ph3051374.
144. Baker, L.Y.; Hobby, C.R.; Siv, A.W.; Bible, W.C.; Glennon, M.S.; Anderson, D.M.; Symes, S.J.; Giles, D.K. *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 1–12, doi:10.1186/s12866-018-1259-8.
145. Kumar, P.; Lee, J.H.; Beyenal, H.; Lee, J. Fatty acids as antibiofilm and antivirulence agents. *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 753–768, doi:10.1016/j.tim.2020.03.014.
146. Macabuhay, A.; Arsova, B.; Walker, R.; Johnson, A.; Watt, M.; Roessner, U. Modulators or facilitators? Roles of lipids in plant root–microbe interactions. *Trends Plant Sci.* **2022**, *27*, 180–190, doi:10.1016/J.TPLANTS.2021.08.004.
147. Park, T.; Im, J.; Kim, A.R.; Lee, D.; Jeong, S.; Yun, C.H.; Han, S.H. Short-chain fatty acids inhibit the biofilm formation of *Streptococcus gordonii* through negative regulation of competence-stimulating peptide signaling pathway. *J. Microbiol.* **2021**, *59*, 1142–1149, doi:10.1007/s12275-021-1576-8.
148. Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Park, S.; Kim, S.; Lee, J. Inhibition of polymicrobial biofilm formation by saw palmetto oil, lauric acid and myristic acid. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15*, 590–602, doi:10.1111/1751-7915.13864.

149. Lee, J.H.; Kim, Y.G.; Park, J.G.; Lee, J. Supercritical fluid extracts of *Moringa oleifera* and their unsaturated fatty acid components inhibit biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Food Control* **2017**, *80*, 74–82, doi:10.1016/j.foodcont.2017.04.035.
150. Yuyama, K.T.; Rohde, M.; Molinari, G.; Stadler, M.; Abraham, W.R. Unsaturated fatty acids control biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1–11, doi:10.3390/antibiotics9110788.
151. Zhou, Y.; Guo, Y.; Sun, X.; Ding, R.; Wang, Y.; Niu, X.; Wang, J.; Deng, X. Application of oleanolic acid and its analogues in combating pathogenic bacteria in vitro/ vivo by a two-pronged strategy of β -lactamases and hemolysins. *ACS Omega* **2020**, *5*, 11424–11438, doi:10.1021/acsomega.0c00460.
152. Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Raorane, C.J.; Oh, S.T.; Park, J.G.; Lee, J. Herring oil and omega fatty acids inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–10, doi:10.3389/FMICB.2018.01241/FULL.
153. Liaw, S.J.; Lai, H.C.; Wang, W.B. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 6836–6845, doi:10.1128/IAI.72.12.6836-6845.2004.
154. Kannan, V.; Bastas, K.; Devi, R. Scientific and economic impact of plant pathogenic bacteria. In *sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria*; Kannan, V., Bastas, K., Devi, R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA, 2015, pp. 369-392.
155. Strange, R.N.; Scott, P.R. Plant disease: A threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43*, 83–116, doi:10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839.
156. Czajkowski, R.; Pérombelon, M.C.M.; Jafra, S.; Lojkowska, E.; Potrykus, M.; Van Der Wolf, J.M.; Sledz, W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: A review. *Ann. Appl. Biol.* **2015**, *166*, 18–38, doi:10.1111/aab.12166.
157. Pritchard, L.; Glover, R.H.; Humphris, S.; Elphinstone, J.G.; Toth, I.K. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 12–24, doi:10.1039/c5ay02550h.
158. Anajjar, B.; Aitmhand, R.; Timinouni, M.; Ennaji, M.M. Characterization by PCR of two strains of *Erwinia carotovora* isolated from the potato rhizosphere in the region of greater Casablanca in Morocco. *EPPO Bull.* **2007**, *37*, 175–180, doi:10.1111/j.1365-2338.2007.01057.x.

159. Cui, Y.; Chatterjee, A.; Yang, H.; Chatterjee, A.K. Regulatory network controlling extracellular proteins in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: FlhDC, the master regulator of flagellar genes, activates *rsmB* regulatory RNA production by affecting *gacA* and *hexA* (*IrhA*) expression. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 4610–4623, doi:10.1128/JB.01828-07.
160. Schwartz, A.R.; Potnis, N.; Timilsina, S.; Wilson, M.; Patané, J.; Martins, J.; Minsavage, G. V.; Dahlbeck, D.; Akhunova, A.; Almeida, N.; et al. Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–17, doi:10.3389/fmicb.2015.00535.
161. Wulff, E.G.; Mguni, C.M.; Mortensen, C.N.; Keswani, C.L.; Hockenhull, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 317–325, doi:10.1023/A:1015671031906.
162. Motyka, A.; Zoledowska, S.; Sledz, W.; Lojkowska, E. Molecular methods as tools to control plant diseases caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* spp: A minireview. *N. Biotechnol.* **2017**, *39*, 181–189, doi:10.1016/j.nbt.2017.08.010.
163. Martins, P.M.M.; Merfa, M. V.; Takita, M.A.; De Souza, A.A. Persistence in phytopathogenic bacteria: Do we know enough? *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–14, doi:10.3389/fmicb.2018.01099.
164. Barron, J.C.; Forsythe, S.J. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 2111–2117, doi:10.4315/0362-028X-70.9.2111.
165. Gunasekera, T.S.; Paul, N.D. Ecological impact of solar ultraviolet-B (UV-B: 320-290 nm) radiation on *Corynebacterium aquaticum* and *Xanthomonas* sp. colonization on tea phyllosphere in relation to blister blight disease incidence in the field. *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *44*, 513–519, doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02102.x.
166. Leonard, S.; Hommais, F.; Nasser, W.; Reverchon, S. Plant–phytopathogen interactions: bacterial responses to environmental and plant stimuli. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 1689–1716, doi:10.1111/1462-2920.13611.
167. Aćimović, S.G.; Zeng, Q.; McGhee, G.C.; Sundin, G.W.; Wise, J.C. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 1–10, doi:10.3389/fpls.2015.00016.

168. Hippler, F.W.R.; Boaretto, R.M.; DAVIS, V.L.; Quaggio, J.A.; Azevedo, R.A.; Mattos-Jr, D. Oxidative stress induced by Cu nutritional disorders in Citrus depends on nitrogen and calcium availability. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-19735-x.
169. McGhee, G.C.; Sundin, G.W. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **2011**, *101*, 192–204, doi:10.1094/PHYTO-04-10-0128.
170. Del Campo, R.; Russi, P.; Mara, P.; Mara, H.; Peyrou, M.; De León, I.P.; Gaggero, C. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *298*, 143–148, doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01709.x.
171. Gochez, A.M.; Huguet-Tapia, J.C.; Minsavage, G. V.; Shantaraj, D.; Jalan, N.; Strauß, A.; Lahaye, T.; Wang, N.; Canteros, B.I.; Jones, J.B.; et al. Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. *BMC Genomics* **2018**, *19*, 1–14, doi:10.1186/s12864-017-4408-9.
172. Richard, D.; Ravigné, V.; Rieux, A.; Facon, B.; Boyer, C.; Boyer, K.; Grygiel, P.; Javegny, S.; Terville, M.; Canteros, B.I.; et al. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. *Mol. Ecol.* **2017**, *26*, 2131–2149, doi:10.1111/mec.14007.
173. Ons, L.; Bylemans, D.; Thevissen, K.; Cammue, B.P.A. Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1–19, doi:10.3390/microorganisms8121930.
174. Lebecka, R.; Zimnoch-Guzowska, E.; Kaczmarek, Z. Resistance to soft rot (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) in tetraploid potato families obtained from 4x-2x crosses. *Am. J. Potato Res.* **2005**, *82*, 203–210, doi:10.1007/BF02853586.
175. Jamiołkowska, A. Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy* **2020**, *10*, 1–11, doi:10.3390/agronomy10020173.
176. Bartolotta, S.; García, C.C.; Candurra, N.A.; Damonte, E.B. Effect of fatty acids on arenavirus replication: Inhibition of virus production by lauric acid. *Arch. Virol.* **2001**, *146*, 777–790, doi:10.1007/s007050170146.
177. Shilling, M.; Matt, L.; Rubin, E.; Visitacion, M.P.; Haller, N.A.; Grey, S.F.; Woolverton, C.J. Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium*

- difficile*. *J. Med. Food* **2013**, *16*, 1079–1085, doi:10.1089/jmf.2012.0303.
178. Fortuoso, B.F.; dos Reis, J.H.; Gebert, R.R.; Barreta, M.; Griss, L.G.; Casagrande, R.A.; de Cristo, T.G.; Santiani, F.; Campigotto, G.; Rampazzo, L.; et al. Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. *Microb. Pathog.* **2019**, *129*, 161–167, doi:10.1016/j.micpath.2019.02.005.
179. Liang, C.; Gao, W.; Ge, T.; Tan, X.; Wang, J.; Liu, H.; Wang, Y.; Han, C.; Xu, Q.; Wang, Q. Lauric acid is a potent biological control agent that damages the cell membrane of phytophthora sojae. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1–9, doi:10.3389/fmicb.2021.666761.
180. Lanzuise, S.; Manganiello, G.; Guastaferrò, V.M.; Vincenzo, C.; Vitaglione, P.; Ferracane, R.; Vecchi, A.; Vinale, F.; Kamau, S.; Lorito, M.; et al. Combined biostimulant applications of *Trichoderma* spp. with fatty acid mixtures improve biocontrol activity, horticultural crop yield and nutritional quality. *Agronomy* **2022**, *12*, 1–22, doi:10.3390/agronomy12020275.
181. Leyva, M.O.; Vicedo, B.; Finiti, I.; Flors, V.; Del Amo, G.; Real, M.D.; García-Agustín, P.; González-Bosch, C. Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. *Plant Pathol.* **2008**, *57*, 1038–1046, doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01891.x.
182. Liu, S.; Ruan, W.; Li, J.; Xu, H.; Wang, J.; Gao, Y.; Wang, J. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia* **2008**, *166*, 93–102, doi:10.1007/s11046-008-9124-1.
183. FAO *The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all*; FAO, Rome, Italy, 2016, P:1-200; ISBN 978-92-5-109185-2.
184. Luis, A.I.S.; Campos, E.V.R.; de Oliveira, J.L.; Fraceto, L.F. Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control. *Rev. Aquac.* **2019**, *11*, 119–132, doi:10.1111/raq.12229.
185. Cabello, F.C.; Godfrey, H.P.; Buschmann, A.H.; Dölz, H.J. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, e127–e133, doi:10.1016/S1473-3099(16)00100-6.
186. Romero-Lorente, M.Á.; Fabrikov, D.; Montes, J.; Morote, E.; Barroso, F.G.; Vargas-García, M.D.C.; Varga, Á.T.; Sánchez-Muros, M.J. Pre-treatment of fish by-products to optimize feeding of *Tenebrio molitor* L. larvae. *Insects* **2022**, *13*, 1–13, doi:10.3390/insects13020125.
187. Kaskhedikar, M.; Chhabra, D. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Vet. World* **2010**, *3*, 76–77.

188. Igbinosa, I.H.; Igumbor, E.U.; Aghdasi, F.; Tom, M.; Okoh, A.I. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Sci. World J.* **2012**, 1–13, doi:10.1100/2012/625023.
189. Martin-Carnahan, A.; Joseph, S.; Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*; Springer, New York, NY, USA, 2005; Volume 2, Part B, 2005; pp. 556–578.
190. Austin, B.; Austin, D.A. *Aeromonadaceae* representatives (motile *Aeromonads*). In *Bacterial Fish Pathogens*; Springer, Dordrecht, Netherlands, 2012; pp. 119–146.
191. Janda, J.M.; Abbott, S.L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 35–73, doi:10.1128/CMR.00039-09.
192. Lin, B.; Chen, S.; Cao, Z.; Lin, Y.; Mo, D.; Zhang, H.; Gu, J.; Dong, M.; Liu, Z.; Xu, A. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 295–301, doi:10.1016/j.molimm.2006.03.001.
193. Dahanayake, P.S.; Hossain, S.; Wickramanayake, M.V.K.S.; Heo, G.J. Antibiotic and heavy metal resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from marketed Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Korea. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 941–952, doi:10.1111/jam.14355.
194. Dallaire-Dufresne, S.; Tanaka, K.H.; Trudel, M. V.; Lafaille, A.; Charette, S.J. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 1–7.
195. Kang, C.H.; Shin, Y.J.; Kim, W.R.; Kim, Y.G.; Song, K.C.; Oh, E.G.; Kim, S.K.; Yu, H.S.; So, J.S. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 918–926, doi:10.1007/s11356-015-5650-9.
196. Gastalho, S.; Silva, G.J.; Ramos, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact. *Acta Farm. Port.* **2014**, *3*, 29–45.
197. Henriques, I.S.; Fonseca, F.; Alves, A.; Saavedra, M.J.; Correia, A. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 938–947, doi:10.1016/j.resmic.2006.09.003.
198. Johann, D.D Pitout Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, *8*, 159–166, doi:10.1016/s1473-3099(08)70041-0.

199. Carvalho, M.J.; Martínez-Murcia, A.; Esteves, A.C.; Correia, A.; Saavedra, M.J. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *159*, 230–239, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.008.
200. Nawaz, M.; Sung, K.; Khan, S.A.; Khan, A.A.; Steele, R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 6461–6466, doi:10.1128/AEM.00271-06.
201. Ndi, O.L.; Barton, M.D. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J. Fish Dis.* **2011**, *34*, 589–599, doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01272.x.
202. Hernould, M.; Gagné, S.; Fournier, M.; Quentin, C.; Arpin, C. Role of the AheABC efflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1559–1563, doi:10.1128/AAC.01052-07.
203. Odeyemi, O.A.; Ahmad, A. Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources. *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *24*, 65–70, doi:10.1016/j.sjbs.2015.09.016.
204. Aravena-Román, M.; Inglis, T.J.J.; Henderson, B.; Riley, T. V.; Chang, B.J. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1110–1112, doi:10.1128/AAC.05387-11.
205. Vila, J.; Ruiz, J.; Gallardo, F.; Vargas, M.; Soler, L.; Figueras, M.J.; Gascon, J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical features and antimicrobial resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 552–555, doi:10.3201/eid0905.020451.
206. Khor, W.C.; Puah, S.M.; Koh, T.H.; Tan, J.A.M.A.; Puthucheary, S.D.; Chua, K.H. Comparison of clinical isolates of *Aeromonas* from singapore and malaysia with regard to molecular identification, virulence, and antimicrobial profiles. *Microb. Drug Resist.* **2018**, *24*, 469–478, doi:10.1089/mdr.2017.0083.
207. Zhou, H.; Gai, C.; Ye, G.; An, J.; Liu, K.; Xu, L.; Cao, H. *Aeromonas hydrophila*, an emerging causative agent of freshwater-farmed whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms* **2019**, *7*, 1–20, doi:10.3390/microorganisms7100450.
208. Dias, C.; Borges, A.; Saavedra, M.J.; Simões, M. Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. from wild animals. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2018**, *12*, 227–234,

doi:10.1016/j.jgar.2017.09.010.

209. Winton, J.R. Fish diseases: Prevention and control strategies. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-54.3.000> **2018**, *54*, 653–654, doi:10.7589/0090-3558-54.3.000.
210. Pereira, C.; Duarte, J.; Costa, P.; Braz, M.; Almeida, A. Bacteriophages in the control of *Aeromonas* sp. in aquaculture systems: An integrative view. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–33, doi:10.3390/antibiotics11020163.
211. Papuc, T.; Boaru, A.; Ladosi, D.; Struti, D.; Georgescu, B. Potential of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as alternative protein source in *Salmonid* feeds - A review. *Indian J. Fish.* **2020**, *67*, 160–170, doi:10.21077/ijf.2020.67.4.100172-20.
212. Tippayadara, N.; Dawood, M.A.O.; Krutmuang, P.; Hoseinifar, S.H.; Doan, H. Van; Paolucci, M. Replacement of fish meal by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal: Effects on growth, haematology, and skin mucus immunity of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Animals* **2021**, *11*, 1–19, doi:10.3390/ani11010193.
213. Sumbule, E.K.; Ambula, M.K.; Osuga, I.M.; Changeh, J.G.; Mwangi, D.M.; Subramanian, S.; Salifu, D.; Alaru, P.A.O.; Githinji, M.; Van Loon, J.J.A.; et al. Cost-effectiveness of black soldier fly larvae meal as substitute of fishmeal in diets for layer chicks and growers. *Sustain.* **2021**, *13*, 1–20, doi:10.3390/su13116074.
214. Makkar, H.P.S. Review: Feed demand landscape and implications of food-not feed strategy for food security and climate change. *Animal* **2018**, *12*, 1744–1754, doi:10.1017/S175173111700324X.
215. Wang, Y.-S.; Shelomi, M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods* **2017**, *6*, 1–23, doi:10.3390/foods6100091.
216. Erickson, M.C.; Islam, M.; Sheppard, C.; Liao, J.; Doyle, M.P. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 685–690, doi:10.4315/0362-028X-67.4.685.
217. Lee, J.; Kim, Y.M.; Park, Y.K.; Yang, Y.C.; Jung, B.G.; Lee, B.J. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae enhances immune activities and increases survivability of broiler chicks against experimental infection of *Salmonella Gallinarum*. *J. Vet. Med. Sci.* **2018**, *80*, 736–740, doi:10.1292/jvms.17-0236.
218. do Couto, M.V.S.; da Costa Sousa, N.; Paixão, P.E.G.; dos Santos Medeiros, E.; Abe, H.A.; Meneses, J.O.; Cunha, F.S.; Filho, R.M.N.; de Sousa, R.C.; Maria, A.N.; et al. Is there

- antimicrobial property of coconut oil and lauric acid against fish pathogen? *Aquaculture* **2021**, *545*, 1–6, doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737234.
219. Giovagnoni, G.; Tugnoli, B.; Piva, A.; Grilli, E. Dual antimicrobial effect of medium-chain fatty acids against an Italian multidrug resistant *Brachyspira hyodysenteriae* strain. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1–11, doi:10.3390/MICROORGANISMS10020301.
220. Vidyasagar, G.M. Plant-derived antifungal agents: past and recent developments. In *Recent trends in antifungal agents and antifungal therapy*; Basak Amit, Ranadhir, C., Mandal, S.M., Eds.; Springer India, 2016; pp. 123–147 ISBN 9788132227823.
221. Khameneh, B.; Iranshahy, M.; Soheili, V.; Fazly Bazzaz, B.S. Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 1–28, doi:10.1186/s13756-019-0559-6.
222. Hofer, U. The cost of antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol* **2019**, *37*, 3–15, doi:10.1038/s41579-018-0125-x.
223. Bhagirath, A.Y.; Li, Y.; Patidar, R.; Yerex, K.; Ma, X.; Kumar, A.; Duan, K. Two component regulatory systems and antibiotic resistance in Gram-negative pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–30, doi:10.3390/ijms20071781.
224. Cheng, P.; Li, F.; Liu, R.; Yang, Y.; Xiao, T.; Ishfaq, M.; Xu, G.; Zhang, X. Prevalence and molecular epidemiology characteristics of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Heilongjiang province, China. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 2505–2518, doi:10.2147/IDR.S208122.
225. Cui, X.; Zhang, H.; Du, H. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Detection and antimicrobial therapy. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–12, doi:10.3389/fmicb.2019.01823.
226. Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M.I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M.H.; Nisar, M.A.; Alvi, R.F.; Aslam, M.A.; Qamar, M.U.; et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 1645–1658, doi:10.2147/IDR.S173867.
227. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327, doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
228. Singh, S.B.; Young, K.; Silver, L.L. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 63–73, doi:10.1016/j.bcp.2017.01.003.

229. Joseph, L.; Merciecca, T.; Forestier, C.; Balestrino, D.; Miquel, S. From *Klebsiella pneumoniae* colonization to dissemination: An overview of studies implementing murine models. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1–29, doi:10.3390/microorganisms9061282.
230. Algammal, A.M.; Hetta, H.F.; Batiha, G.E.; Hozzein, W.N.; El Kazzaz, W.M.; Hashem, H.R.; Tawfik, A.M.; El-Tarabili, R.M. Virulence-determinants and antibiotic-resistance genes of MDR-*E. coli* isolated from secondary infections following FMD-outbreak in cattle. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13, doi:10.1038/s41598-020-75914-9.
231. Algammal, A.M.; Hetta, H.F.; Elkelish, A.; Alkhalifah, D.H.H.; Hozzein, W.N.; Batiha, G.E.S.; Nahhas, N. El; Mabrok, M.A. Methicillin-resistant *Saphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 3255–3265, doi:10.2147/IDR.S272733.
232. Doorduyn, D.J.; Rooijackers, S.H.M.; van Schaik, W.; Bardoel, B.W. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology* **2016**, *221*, 1102–1109, doi:10.1016/j.imbio.2016.06.014.
233. Lev, A.I.; Astashkin, E.I.; Kislichkina, A.A.; Solovieva, E. V.; Kombarova, T.I.; Korobova, O. V.; Ershova, O.N.; Alexandrova, I.A.; Malikov, V.E.; Bogun, A.G.; et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health* **2018**, *112*, 142–151, doi:10.1080/20477724.2018.1460949.
234. Wang, C.; Xia, W.; Jiang, Q.; Xu, Y.; Yu, P. Protective effects of lipid extract from brains of silver carp against oxidative damage in HEK-293 cells. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 30855–30861, doi:10.1039/c7ra00362e.
235. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100.*; 28th ed.; Wayne, Pennsylvania, USA, 2018, pp. 1-296; ISBN 156238838X.
236. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
237. Xu, Q.; Yang, X.; Chan, E.W.C.; Chen, S. The hypermucoviscosity of hypervirulent *K. pneumoniae* confers the ability to evade neutrophil-mediated phagocytosis. *Virulence* **2021**, *12*, 2050–2059, doi:10.1080/21505594.2021.1960101.

238. Sánchez-López, J.; García-Caballero, A.; Navarro-San Francisco, C.; Quereda, C.; Ruiz-Garbajosa, P.; Navas, E.; Dronda, F.; Morosini, M.I.; Cantón, R.; Díez-Aguilar, M. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: A challenge in community acquired infection. *IDCases* **2019**, *17*, 1–3, doi:10.1016/j.idcr.2019.e00547.
239. Oliveira, C.S.D.; Moreira, P.; Resende, J.; Cruz, M.T.; Pereira, C.M.F.; Silva, A.M.S.; Santos, S.A.O.; Silvestre, A.J.D. Characterization and cytotoxicity assessment of the lipophilic fractions of different morphological parts of *Acacia dealbata*. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9–11, doi:10.3390/ijms21051814.
240. Petropoulos, S.A.; Fernandes, Â.; Calhelha, R.C.; Roupael, Y.; Petrović, J.; Soković, M.; Ferreira, I.C.F.R.; Barros, L. Antimicrobial properties, cytotoxic effects, and fatty acids composition of vegetable oils from purslane, linseed, luffa, and pumpkin seeds. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1–16, doi:10.3390/app11125738.
241. Vilakazi, H.; Olasehinde, T.A.; Olaniran, A.O. Chemical characterization, antiproliferative and antioxidant activities of polyunsaturated fatty acid-rich extracts from *Chlorella* sp. s14. *Molecules* **2021**, *26*, 1–13, doi:10.3390/molecules26144109.
242. Choi, W.H.; Yun, J.H.; Chu, J.P.; Chu, K.B. Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (diptera: *Stratiomyidae*) larvae against gram-negative bacteria. *Entomol. Res.* **2012**, *42*, 219–226, doi:10.1111/j.1748-5967.2012.00465.x.
243. Park, K.H.; Kwak, K.W.; Nam, S.H.; Choi, J.Y.; Hyun, S.; Kim, H.G.; Kim, S.H. Antibacterial activity of larval extract from the black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera: *Stratiomyidae*) against plant pathogens. *J. Entomol. Zool. Stud.* **2015**, *3*, 176–179, doi:10.1111/j.1748-5967.2012.00465.
244. Sledz, W.; Los, E.; Paczek, A.; Rischka, J.; Motyka, A.; Zoledowska, S.; Piosik, J.; Lojkowska, E. Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria. *Acta Biochim. Pol.* **2015**, *62*, 605–612, doi:10.18388/abp.2015_1092.
245. Hong, H.; Lee, J.H.; Kim, S.K. Phytochemicals and antioxidant capacity of some tropical edible plants. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **2018**, *31*, 1677–1684, doi:10.5713/ajas.17.0903.
246. Teh, C.H.; Nazni, W.A.; Nurulhusna, A.H.; Norazah, A.; Lee, H.L. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 1–8, doi:10.1186/s12866-017-0936-3.
247. Canche-Escamilla, G.; Colli-Acevedo, P.; Borges-Argaez, R.; Quintana-Owen, P.; May-Crespo,

- J.F.; Cáceres-Farfan, M.; Yam Puc, J.A.; Sansores-Peraza, P.; Vera-Ku, B.M. Extraction of phenolic components from an *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) crop and their potential as antimicrobials and textile dyes. *Sustain. Chem. Pharm.* **2019**, *14*, 1–8, doi:10.1016/j.scp.2019.100168.
248. Soberón, J.R.; Sgariglia, M.A.; Dip Maderuelo, M.R.; Andina, M.L.; Sampietro, D.A.; Vattuone, M.A. Antibacterial activities of *Ligaria cuneifolia* and *Jodina rhombifolia* leaf extracts against phytopathogenic and clinical bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *118*, 599–605, doi:10.1016/j.jbiosc.2014.04.018.
249. Meziani, S.; Oomah, B.D.; Zaidi, F.; Simon-Levert, A.; Bertrand, C.; Zaidi-Yahiaoui, R. Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*. *Microb. Pathog.* **2015**, *78*, 95–102, doi:10.1016/j.micpath.2014.12.001.
250. Glenz, R.; Kaiping, A.; Göpfert, D.; Weber, H.; Lambour, B.; Sylvester, M.; Fröschel, C.; Mueller, M.J.; Osman, M.; Waller, F. The major plant sphingolipid long chain base phytosphingosine inhibits growth of bacterial and fungal plant pathogens. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1–9, doi:10.1038/s41598-022-05083-4.
251. Sneddon, J.; Masuram, S.; Richert, J.C. Gas chromatography-mass spectrometry-basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 1003–1012, doi:10.1080/00032710701300648.
252. Mani, D.; Kalpana, M.S.; Patil, D.J.; Dayal, A.M. Organic matter in gas shales: origin, evolution, and characterization. In *Shale gas: Exploration and environmental and economic impacts*; Elsevier Inc, 2017, pp.25-54 ISBN 9780128095355.
253. Roberts, L.D.; McCombie, G.; Titman, C.M.; Griffin, J.L. A matter of fat: An introduction to lipidomic profiling methods. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *871*, 174–181, doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.002.
254. Ecker, J.; Scherer, M.; Schmitz, G.; Liebisch, G. A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *897*, 98–104, doi:10.1016/j.jchromb.2012.04.015.
255. Sugumaran, M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* **2002**, *15*, 2–9, doi:10.1034/j.1600-0749.2002.00056.x.

256. Park, K.H.; Zeon, S.R.; Lee, J.G.; Choi, S.H.; Shin, Y.K.; Park, K.I. *In vitro* and *in vivo* efficacy of drugs against the protozoan parasite *Azumiobodo hoyamushi* that causes soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi* (Drasche). *J. Fish Dis.* **2014**, *37*, 309–317, doi:10.1111/jfd.12104.
257. Ewald, N.; Vidakovic, A.; Langeland, M.; Kiessling, A.; Sampels, S.; Lalander, C. Fatty acid composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) – Possibilities and limitations for modification through diet. *Waste Manag.* **2020**, *102*, 40–47, doi:10.1016/j.wasman.2019.10.014.
258. Meneguz, M.; Schiavone, A.; Gai, F.; Dama, A.; Lussiana, C.; Renna, M.; Gasco, L. Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 5776–5784, doi:10.1002/jsfa.9127.
259. Kotan, R.; Cakir, A.; Ozer, H.; Kordali, S.; Cakmakci, R.; Dadasoglu, F.; Dikbas, N.; Aydin, T.; Kazaz, C. Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2014**, *172*, 210–220, doi:10.1016/j.scienta.2014.03.016.
260. Shea, K.M. Antibiotic resistance: What is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? *Pediatrics* **2003**, *112*, 253–258.
261. Sumayo, M.S.; Kwon, D.K.; Ghim, S.Y. Linoleic acid-induced expression of defense genes and enzymes in tobacco. *J. Plant Physiol.* **2014**, *171*, 1757–1762, doi:10.1016/j.jplph.2014.08.015.
262. Skřivanová, E.; Molatová, Z.; Marounek, M. Effects of caprylic acid and triacylglycerols of both caprylic and capric acid in rabbits experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Vet. Microbiol.* **2008**, *126*, 372–376, doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.010.
263. Cohen, Y.; Gisi, U.; Mosinger, E. Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1991**, *38*, 255–263, doi:10.1016/S0885-5765(05)80117-1.
264. Bleichert, S.; Brodschelm, W.; Hölder, S.; Kammerer, L.; Kutchan, T.M.; Mueller, M.J.; Xia, Z.Q.; Zenk, M.H. The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 4099–4105, doi:10.1073/pnas.92.10.4099.
265. Farmer, E.E.; Ryan, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **1992**, *4*, 129–134, doi:10.1105/tpc.4.2.129.
266. Kumar, P.P.; Kumaravel, S.; Lalitha, C. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-

- MS study of *Vitex negundo*. *African J. Biochem. Res.* **2010**, *4*, 191–195.
267. Awa, E.P.; Ibrahim, S.; Ameh, D.A. GC/MS Analysis and Antimicrobial activity of Diethyl ether fraction of methanolic extract from the stem bark of *Annona senegalensis* pers. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, *3*, 4213–4218, doi:http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(11).4213-18.
268. Ouattara, B.; Simard, R.E.; Holley, R.A.; Piette, G.J.P.; Bégin, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* **1997**, *37*, 155–162, doi:10.1016/S0168-1605(97)00070-6.
269. Nair, R.R. Agnihotra Yajna: A prototype of south Asian traditional medical knowledge. *JAMS J. Acupunct. Meridian Stud.* **2017**, *10*, 143–150, doi:10.1016/j.jams.2016.11.002.
270. Rahuman, A.A.; Gopalakrishnan, G.; Ghouse, B.S.; Arumugam, S.; Himalayan, B. Effect of *Feronia limonia* on mosquito larvae; Elsevier, 2000; Vol. 71;553-555.
271. Khalil, A.S.; Rahim, A.A.; Taha, K.K.; Abdallah, K.B. Characterization of methanolic extracts of agarwood leaves. *J. Appl. Ind. Sci.* **2013**, *1*, 78–88.
272. Duke, J.A. *Handbook of biologically active phytochemicals and their activities*; 1 st editi.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, Florida, USA, 1992, pp. 1-182; ISBN 9780849336706.
273. Chandrasekaran, M.; Kannathasan, K.; Venkatesalu, V. Antimicrobial activity of fatty acid methyl esters of some members of *Chenopodiaceae*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2008**, *63*, 331–336, doi:10.1515/znc-2008-5-604.
274. Enig, M.G. *Lauric oils as antimicrobial agents: theory of effect, scientific rationale, and dietary application as adjunct nutritional support for HIV-infected individuals In: Nutrients and foods in AIDS*; Watson, R.R., Ed.; 1 st.; CRC Press, 1998, pp. 81-97;
275. Pinto, M.E.A.; Araújo, S.G.; Morais, M.I.; Sá, N.P.; Lima, C.M.; Rosa, C.A.; Siqueira, E.P.; Johann, S.; Lima, L.A.R.S. Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2017**, *89*, 1671–1681, doi:10.1590/0001-3765201720160908.
276. Sahin, N.; Kula, I.; Erdogan, Y. Investigation of antimicrobial activities of nonanoic acid derivatives. *Fresenius Environ. Bull.* **2006**, *15*, 141–143.
277. Chandrasekaran, M.; Senthilkumar, A.; Venkatesalu, V. Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2011**, *15*, 775–780.

278. Abou-Elela, G.M.; Abd-Elnaby, H.; Ibrahim, H.A.H.; Okbah, M.A. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *World Appl. Sci. J.* **2009**, *7*, 872–880.
279. McGaw, L.J.; Jäger, A.K.; Van Staden, J. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African J. Bot.* **2002**, *68*, 417–423, doi:10.1016/S0254-6299(15)30367-7.
280. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. CLSI document M07-A10.; 10th ed.; Wayne, Pennsylvania, USA, 2015; P: 27-29 ISBN 1562389874.
281. Wamala, S.P.; Mugimba, K.K.; Mutoloki, S.; Evensen, O.; Mdegela, R.; Byarugaba, D.K.; Sørum, H. Occurrence and antibiotic susceptibility of fish bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and *Clarias gariepinus* (African catfish) in Uganda. *Fish. Aquat. Sci.* **2018**, *21*, 1–10, doi:10.1186/s41240-017-0080-x.
282. Yang, C.; Song, G.; Lim, W. A review of the toxicity in fish exposed to antibiotics. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C* **2020**, *Part C 237*, 1–12, doi:10.1016/j.cbpc.2020.108840.
283. El-Saber Batiha, G.; Hussein, D.E.; Algammal, A.M.; George, T.T.; Jeandet, P.; Al-Snafi, A.E.; Tiwari, A.; Pagnossa, J.P.; Lima, C.M.; Thorat, N.D.; et al. Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. *Food Control* **2021**, *126*, 1–14, doi:10.1016/j.foodcont.2021.108066.
284. Yin, Z.; Zhu, L.; Li, S.; Hu, T.; Chu, R.; Mo, F.; Hu, D.; Liu, C.; Li, B. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresour. Technol.* **2020**, *301*, 1–19, doi:10.1016/j.biortech.2020.122804.
285. Rangel-López, L.; Zaragoza-Bastida, A.; Valladares-Carranza, B.; Peláez-Acero, A.; Sosa-Gutiérrez, C.G.; Hetta, H.F.; Batiha, G.E.S.; Alqahtani, A.; Rivero-Perez, N. In vitro antibacterial potential of *Salix babylonica* extract against bacteria that affect *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis* spp. *Animals* **2020**, *10*, 1–10, doi:10.3390/ani10081340.
286. Wei, L.S.; Wee, W.; Siong, J.Y.F.; Syamsumir, D.F. Characterization of antimicrobial, antioxidant, anticancer property and chemical composition of *Michelia champaca* seed and flower extracts. *Stamford J. Pharm. Sci.* **2011**, *4*, 19–24, doi:10.3329/sjps.v4i1.8862.
287. Marimuthu, K.; Gunaselvam, P.; Rahman, M.A.; Xavier, R.; Arockiaraj, J.; Subramanian, S.; Yusoff, F.M.; Arshad, A. Antibacterial activity of ovary extract from sea urchin *Diadema*

- setosum*. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2015**, *19*, 1895–1899.
288. Yin, L.; Chen, J.; Wang, K.; Geng, Y.; Lai, W.; Huang, X.; Chen, D.; Guo, H.; Fang, J.; Chen, Z.; et al. Study the antibacterial mechanism of cinnamaldehyde against drug-resistant *Aeromonas hydrophila* in vitro. *Microb. Pathog.* **2020**, *145*, 1–7, doi:10.1016/j.micpath.2020.104208.
289. Zhang, H.; Ge, X.; Liu, B.; Teng, T.; Zhou, Q.; Sun, C.; Song, C. Comparative transcriptomic and proteomic analysis of the antibacterial activity of emodin on *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* **2020**, *529*, 1–14, doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735589.
290. Schrader, K.K.; Ibrahim, M.A.; Abd-Alla, H.I.; Cantrell, C.L.; Pasco, D.S. Antibacterial activities of metabolites from *Vitis rotundifolia* (muscadine) roots against fish pathogenic bacteria. *Molecules* **2018**, *23*, 1–8, doi:10.3390/molecules23112761.
291. Kot, B.; Kwiatek, K.; Janiuk, J.; Witeska, M.; Pękala-Safińska, A. Antibacterial activity of commercial phytochemicals against *Aeromonas* species isolated from fish. *Pathogens* **2019**, *8*, 1–12, doi:10.3390/pathogens8030142.
292. Rangel-López, L.; Rivero-Perez, N.; Valladares-Carranza, B.; Olmedo-Juárez, A.; Delgadillo-Ruiz, L.; Vega-Sánchez, V.; Hori-Oshima, S.; Nassan, M.A.; Batiha, G.E.-S.; Zaragoza-Bastida, A. Antibacterial potential of *Caesalpinia coriaria* (Jacq) wild fruit against *Aeromonas* spp. of aquaculture importance. *Animals* **2022**, *12*, 1–12, doi:10.3390/ani12040511.
293. Sabarinathan, D.; Vanaraj, S.; Sathiskumar, S.; Poorna Chandrika, S.; Sivarasan, G.; Arumugam, S.S.; Preethi, K.; Li, H.; Chen, Q. Characterization and application of rhamnolipid from *Pseudomonas plecoglossicida* BP03. *Lett. Appl. Microbiol.* **2021**, *72*, 251–262, doi:10.1111/lam.13403.
294. Ouyang, P.; Chen, J.; Yin, L.; Geng, Y.; Chen, D.; Wang, K.; Lai, W.; Guo, H.; Fang, J.; Chen, Z.; et al. The sub-inhibitory concentration of cinnamaldehyde resists *Aeromonas hydrophila* pathogenicity via inhibition of W-pili production. *Aquac. Int.* **2021**, *29*, 1639–1655, doi:10.1007/s10499-021-00705-6.
295. Dong, J.; Zhang, D.; Li, J.; Liu, Y.; Zhou, S.; Yang, Y.; Xu, N.; Yang, Q.; Ai, X. Genistein inhibits the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* by disrupting quorum sensing mediated biofilm formation and aerolysin production. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 1–10, doi:10.3389/fphar.2021.753581.
296. Brahmachari, G. Discovery and development of neuroprotective agents from natural products: An overview. In *Discovery and development of neuroprotective agents from natural products*;

Elsevier Inc, 2017, pp. 1-7 ISBN 978-0-12-809593-5.

297. Mai, H.C.; Dao, N.D.; Lam, T.D.; Nguyen, B.V.; Nguyen, D.C.; Bach, L.G. Purification process, physicochemical properties, and fatty acid composition of black soldier fly (*Hermetia illucens* Linnaeus) larvae oil. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **2019**, *96*, 1303–1311, doi:10.1002/aocs.12263.
298. Rabani, V.; Cheatsazan, H.; Davani, S. Proteomics and lipidomics of black soldier fly (Diptera: *Stratiomyidae*) and blow fly (Diptera: *Calliphoridae*) larvae. *J. Insect Sci.* **2019**, *19*, 1–9, doi:10.1093/jisesa/iez050.
299. Imbimbo, P.; Romanucci, V.; Pollio, A.; Fontanarosa, C.; Amoresano, A.; Zarrelli, A.; Olivieri, G.; Monti, D.M. A cascade extraction of active phycocyanin and fatty acids from *Galdieria phlegrea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 9455–9464, doi:10.1007/s00253-019-10154-0.
300. Bahadi, M.; Yusoff, M.F.; Salimon, J.; Al-Wali Japir, A.; Derawi, D. Optimization of low-temperature methanol crystallization for unsaturated fatty acids separation from crude palm fatty acids mixture using response surface methodology. *Asian J. Chem.* **2019**, *31*, 1617–1625, doi:10.14233/ajchem.2019.21974.
301. Dana, D.; Blumenthal, M.M.; Saguy, I.S. The protective role of water injection on oil quality in deep fat frying conditions. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 104–109, doi:10.1007/s00217-003-0744-x.
302. Bergsson, G.; Steingrímsson, Ó.; Thormar, H. In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2790–2792, doi:10.1128/aac.43.11.2790.
303. Fischer, C.L. Antimicrobial activity of host-derived lipids. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1–17, doi:10.3390/antibiotics9020075.
304. Thirunavukarasu, N.; Panda, R.C. Modeling, identification, and control for the production of glycerol by the hydrolysis of tallow. *Rev. Chem. Eng.* **2015**, *31*, 345–359, doi:10.1515/revce-2014-0047.
305. Naz, S.; Siddiqi, R.; Sheikh, H.; Sayeed, S.A. Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 127–134, doi:10.1016/j.foodres.2004.08.002.
306. Van Gerpen, J.; Knothe, G. Biodiesel Production. In *The Biodiesel Handbook*; AOCS Press, USA,

- 2010; pp. 31–96.
307. Saegeman, V.S.M.; Ectors, N.L.; Lismont, D.; Verduyckt, B.; Verhaegen, J. Short- and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. *Burns* **2008**, *34*, 205–211, doi:10.1016/j.burns.2007.02.009.
 308. Singh, B.R. Antibacterial activity of glycerol, lactose, maltose, mannitol, raffinose and xylose. *Noto-are* **2014**, *7*, 1–3.
 309. Duc Nguyen, T.; Casareto, B.E.; Ramphul, C.; Toyoda, K.; Suzuki, T.; Fujiwara, T.; Suzuki, Y. Glycerol enhances growth and antimicrobial properties of selected *Vibrio* bacteria associated with the coral montipora digitata. *Res. J. Microbiol.* **2018**, *13*, 127–137, doi:10.3923/jm.2018.127.137.
 310. Sabri, N.A.; Schmitt, H.; Van Der Zaan, B.; Gerritsen, H.W.; Zuidema, T.; Rijnaarts, H.H.M.; Langenhoff, A.A.M. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *J. Environ. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 1–11, doi:10.1016/j.jece.2018.03.004.
 311. Le, T.; Wang, L.; Zeng, C.; Fu, L.; Liu, Z.; Hu, J. Clinical and microbiological characteristics of nosocomial, healthcare-associated, and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in Guangzhou, China. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2021**, *10*, 1–11, doi:10.1186/s13756-021-00910-1.
 312. Giedraitiene, A.; Vitkauskiene, A.; Naginiene, R.; Pavilonis, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (B. Aires)*. **2011**, *47*, 137–146, doi:10.3390/medicina47030019.
 313. Kareem, S.M.; Al-Kadmy, I.M.S.; Kazaal, S.S.; Ali, A.N.M.; Aziz, S.N.; Makharita, R.R.; Algammal, A.M.; Al-Rejaie, S.; Behl, T.; Batiha, G.E.S.; et al. Detection of *gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 555–563, doi:10.2147/IDR.S275852.
 314. Bhatia, P.; Sharma, A.; George, A.J.; Anvitha, D.; Kumar, P.; Dwivedi, V.P.; Chandra, N.S. Antibacterial activity of medicinal plants against ESKAPE: An update. *Heliyon* **2021**, *7*, 1–12, doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06310.
 315. Karaiskos, I.; Lagou, S.; Pontikis, K.; Rapti, V.; Poulakou, G. The “Old” and the “New” antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. *Front. Public Heal.* **2019**, *7*, 1–25, doi:10.3389/fpubh.2019.00151.
 316. Jain, N.; Jansone, I.; Obidenova, T.; Simanis, R.; Meisters, J.; Straupmane, D.; Reinis, A.

- Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of gram-negative bacteria: Public health implications in the latvian context. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1–19, doi:10.3390/antibiotics10070791.
317. Hu, Y.; Liu, Y.; Coates, A. Azidothymidine produces synergistic activity in combination with colistin against antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother* **2019**, *63*, 1–11, doi:10.1128/AAC.01630-18.
318. Venkata Mohan, S.; Rohit, M. V.; Chiranjeevi, P.; Chandra, R.; Navaneeth, B. Heterotrophic *Microalgae* cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresour. Technol.* **2015**, *184*, 169–178, doi:10.1016/j.biortech.2014.10.056.
319. kabara, J.J.; swieczkowski, D.M.; Conley, A.J.; Truant, J.P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *2*, 23–28.
320. Saviane, A.; Tassoni, L.; Naviglio, D.; Lupi, D.; Savoldelli, S.; Bianchi, G.; Cortellino, G.; Bondioli, P.; Folegatti, L.; Casartelli, M.; et al. Mechanical processing of *Hermetia illucens* larvae and *Bombyx mori* pupae produces oils with antimicrobial activity. *Animals* **2021**, *11*, 1–17, doi:10.3390/ani11030783.
321. Özçelik, B.; Aslan, M.; Orhan, I.; Karaoglu, T. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiol. Res.* **2005**, *160*, 159–164, doi:10.1016/j.micres.2004.11.002.
322. Shannon, E.; Abu-Ghannam, N. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 1–23, doi:10.3390/md14040081.
323. Potocki, L.; Oklejewicz, B.; Kuna, E.; Szpyrka, E.; Duda, M.; Zuczek, J. Application of green algal *Planktochlorella nurekis* biomasses to modulate growth of selected microbial species. *Molecules* **2021**, *26*, 1–19, doi:10.3390/molecules26134038.
324. Čermák, L.; Pražáková; Marounek, M.; Skřivan, M.; Skřivanová, E. Effect of green alga *Planktochlorella nurekis* on selected bacteria revealed antibacterial activity in vitro. *Czech J. Anim. Sci.* **2015**, *60*, 427–435, doi:10.17221/8522-CJAS.
325. Ismail, A.; Ktari, L.; Ben Redjem Romdhane, Y.; Aoun, B.; Sadok, S.; Boudabous, A.; El Bour, M. Antimicrobial fatty acids from green alga *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–12, doi:10.1155/2018/3069595.
326. El Shafay, S.M.; Ali, S.S.; El-Sheekh, M.M. Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. *Egypt. J. Aquat. Res.* **2016**, *42*, 65–74,

doi:10.1016/j.ejar.2015.11.006.

327. Supardy, N.A.; Ibrahim, D.; Sulaiman, S.F.; Zakaria, N.A. Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 cells by hexane extract of *Halimeda discoidea* (Decaisne) and the identification of its potential bioactive compounds. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*, 872–881, doi:10.4014/jmb.1111.11053.
328. Skalicka-Woźniak, K.; Los, R.; Głowniak, K.; Malm, A. Antimicrobial activity of fatty acids from fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum*. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 2748–2754, doi:10.1002/cbdv.201000008.
329. P. Desbois, A. Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agriculture and other industries. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2012**, *7*, 111–122, doi:10.2174/157489112801619728.
330. Desbois, A.P.; Lawlor, K.C. Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4544–4557, doi:10.3390/md11114544.
331. Duan, H.; Zhang, X.; Li, Z.; Yuan, J.; Shen, F.; Zhang, S. Synergistic effect and antibiofilm activity of an antimicrobial peptide with traditional antibiotics against multi-drug resistant bacteria. *Microb. Pathog.* **2021**, *158*, 1–8, doi:10.1016/j.micpath.2021.105056.
332. Liu, T.; Zhu, N.; Zhong, C.; Zhu, Y.; Gou, S.; Chang, L.; Bao, H.; Liu, H.; Zhang, Y.; Ni, J. Effect of N-methylated and fatty acid conjugation on analogs of antimicrobial peptide Anoplin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *152*, 1–18, doi:10.1016/j.ejps.2020.105453.
333. Armas, F.; Di Stasi, A.; Mardirossian, M.; Romani, A.A.; Benincasa, M.; Scocchi, M. Effects of lipidation on a proline-rich antibacterial peptide. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–14, doi:10.3390/ijms22157959.
334. Tian, Z.; Feng, Q.; Sun, H.; Liao, Y.; Du, L.; Yang, R.; Li, X.; Yang, Y.; Xia, Q. Isolation and purification of active antimicrobial peptides from *Hermetia illucens* L., and its effects on CNE2 cells. *bioRxiv* **2018**, *2018*, 1–42, doi:10.1101/353367.
335. Lee, K.S.; Yun, E.Y.; Goo, T.W. Antimicrobial activity of an extract of *Hermetia illucens* larvae immunized with *Lactobacillus casei* against *salmonella* species. *Insects* **2020**, *11*, 1–11, doi:10.3390/insects11100704.
336. Somaida, A.; Tariq, I.; Ambreen, G.; Abdelsalam, A.M.; Ayoub, A.M.; Wojcik, M.; Dzoyem, J.P.; Bakowsky, U. Potent cytotoxicity of four cameroonian plant extracts on different cancer cell

- lines. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 1–19, doi:10.3390/ph13110357.
337. Puttamreddy, S.; Cornick, N.A.; Minion, F.C. Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 2377–2384, doi:10.1128/IAI.00156-10.
338. Piperaki, E.T.; Syrogiannopoulos, G.A.; Tzouvelekis, L.S.; Daikos, G.L. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 1002–1005, doi:10.1097/INF.0000000000001675.
339. Schmid, J.; Sieber, V.; Rehm, B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–24, doi:10.3389/FMICB.2015.00496.
340. Reza, A.; Mark Sutton, J.; Rahman, K.M. Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram-negative (ESKAPEE) bacteria. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **2019**, *8*, 1–19, doi:10.3390/ANTIBIOTICS8040229.
341. Chmielewska, S.J.; Skłodowski, K.; Piktel, E.; Suprewicz, Ł.; Fiedoruk, K.; Daniluk, T.; Wolak, P.; Savage, P.B.; Bucki, R. Ndm-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* are highly susceptible to ceragenins csa-13, csa-44, and csa-131. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 3277–3294, doi:10.2147/IDR.S261579.
342. Nirwati, H.; Sinanjung, K.; Fahrurissa, F.; Wijaya, F.; Napitupulu, S.; Hati, V.P.; Hakim, M.S.; Meliala, A.; Aman, A.T.; Nuryastuti, T. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proc.* **2019**, *13*, 1–9, doi:10.1186/s12919-019-0176-7.
343. Oleksy-Wawrzyniak, M.; Junka, A.; Brożyna, M.; Paweł, M.; Kwiec, B.; Nowak, M.; Mączyńska, B.; Bartoszewicz, M. The in vitro ability of *Klebsiella pneumoniae* to form biofilm and the potential of various compounds to eradicate it from urinary catheters. *Pathogens* **2022**, *11*, 1–24, doi:10.3390/pathogens11010042.
344. Right, C.; Alotaibi, G.F.; Bukhari, M.A. Factors influencing bacterial biofilm formation and development. *Am J Biomed Sci Res* *12*, 617–626, doi:10.34297/AJBSR.2021.12.001820.
345. Mohamed, H.; Marusich, E.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Bacterial outer membrane permeability increase underlies the bactericidal effect of fatty acids from *Hermetia illucens* (Black soldier fly) larvae fat against hypermucoviscous isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol* **2022**, *13*, 1–19, doi:10.3389/fmicb.2022.844811.
346. Trunk, T.; S. Khalil, H.; C. Leo, J. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 140–164,

doi:10.3934/microbiol.2018.1.140.

347. Song, Y.J.; Yu, H.H.; Kim, Y.J.; Lee, N.K.; Paik, H.D. Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 1177–1183, doi:10.4014/JMB.1905.05022.
348. Shon, A.S.; Bajwa, R.P.S.; Russo, T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence* **2013**, *4*, 107–118, doi:10.4161/viru.22718.
349. Wu, M.C.; Lin, T.L.; Hsieh, P.F.; Yang, H.C.; Wang, J.T. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PLoS One* **2011**, *6*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0023500.
350. Zheng, J.X.; Lin, Z.W.; Chen, C.; Chen, Z.; Lin, F.J.; Wu, Y.; Yang, S.Y.; Sun, X.; Yao, W.M.; Li, D.Y.; et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of *wcaG*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 1–9, doi:10.3389/fcimb.2018.00021.
351. Yang, X.; Wai-Chi Chan, E.; Zhang, R.; Chen, S. A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 2039–2043, doi:10.1038/s41564-019-0566-7.
352. Xie, M.; Chen, K.; Ye, L.; Yang, X.; Xu, Q.; Yang, C.; Dong, N.; Chan, E.W.C.; Sun, Q.; Shu, L.; et al. Conjugation of virulence plasmid in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains through formation of a fusion plasmid. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, 1–10, doi:10.1002/adbi.201900239.
353. Choi, N.Y.; Bae, Y.M.; Lee, S.Y. Cell surface properties and biofilm formation of pathogenic bacteria. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*, 2257–2264, doi:10.1007/s10068-015-0301-y.
354. Chiarelli, A.; Cabanel, N.; Rosinski-Chupin, I.; Zongo, P.D.; Naas, T.; Bonnin, R.A.; Glaser, P. Diversity of mucoid to non-mucoid switch among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 1–14, doi:10.1186/s12866-020-02007-y.
355. Vishwakarma, J.; Waghela, B.; Falcao, B.; Vavilala, S.L. Algal polysaccharide's potential to combat respiratory infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* biofilms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2022**, *194*, 671–693, doi:10.1007/s12010-021-03632-7.
356. Nithyanand, P.; Beema Shafreen, R.M.; Muthamil, S.; Karutha Pandian, S. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. *Microbiol. Res.* **2015**, *179*, 20–28, doi:10.1016/j.micres.2015.06.009.
357. Tyfa, A.; Kunicka-Styczyńska, A.; Zabielska, J. Evaluation of hydrophobicity and quantitative

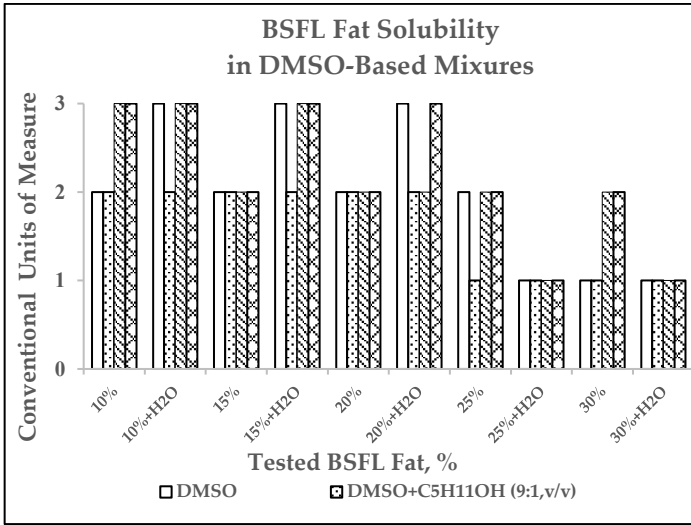
- analysis of biofilm formation by *Alicyclobacillus* sp. *Acta Biochim. Pol.* **2015**, *62*, 785–790, doi:10.18388/abp.2015_1133.
358. Sun, E.; Liu, S.; Hancock, R.E.W. Surfing motility: A conserved yet diverse adaptation among motile bacteria. *J. Bacteriol.* **2018**, *200*, 1–13, doi:10.1128/JB.00394-18.
359. Carabarin-Lima, A.; León-Izurieta, L.; del Carmen Rocha-Gracia, R.; Castañeda-Lucio, M.; Torres, C.; Gutiérrez-Cazarez, Z.; González-Posos, S.; Martínez de la Peña, C.F.; Martínez-Laguna, Y.; Lozano-Zarain, P. First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *J. Med. Microbiol.* **2016**, *65*, 729–737, doi:10.1099/jmm.0.000291.
360. Sharma, D.; Garg, A.; Kumar, M.; Rashid, F.; Khan, A.U. Down-regulation of flagellar, fimbriae, and pili proteins in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (NDM-4) clinical isolates: A novel linkage to drug resistance. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–9, doi:10.3389/FMICB.2019.02865/FULL.
361. Singh, V.K.; Kavita, K.; Prabhakaran, R.; Jha, B. Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling* **2013**, *29*, 855–867, doi:10.1080/08927014.2013.807914.
362. Balkrishna, A.; Gupta, A.K.; Singh, K.; Haldar, S.; Varshney, A. Effects of fatty acids in super critical fluid extracted fixed oil from *Withania somnifera* seeds on Gram-negative *Salmonella enterica* biofilms. *Phytomedicine Plus* **2021**, *1*, 1–11, doi:10.1016/j.phyflu.2021.100047.
363. Eder, A.E.; Munir, S.A.; Hobby, C.R.; Anderson, D.M.; Herndon, J.L.; Siv, A.W.; Symes, S.J.K.; Giles, D.K. Exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) alter phospholipid composition, membrane permeability, biofilm formation and motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiol. (United Kingdom)* **2017**, *163*, 1626–1636, doi:10.1099/mic.0.000556.
364. Kwiatkowski, P.; Sienkiewicz, M.; Pruss, A.; Łopusiewicz, Ł.; Arszyńska, N.; Wojciechowska-Koszko, I.; Kilanowicz, A.; Kot, B.; Dołęgowska, B. Antibacterial and anti-biofilm activities of essential oil compounds against New DelhiMetallo- β -lactamase-1-producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–14, doi:10.3390/antibiotics11020147.
365. Galdiero, E.; Ricciardelli, A.; D'Angelo, C.; de Alteriis, E.; Maione, A.; Albarano, L.; Casillo, A.; Corsaro, M.M.; Tutino, M.L.; Parrilli, E. Pentadecanoic acid against *Candida albicans*-*Klebsiella pneumoniae* biofilm: towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections. *Res. Microbiol.* **2021**, *172*, 1–11, doi:10.1016/j.resmic.2021.103880.

366. Jiang, Y.; Geng, M.; Bai, L. Targeting biofilms therapy: Current research strategies and development hurdles. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1–34, doi:10.3390/microorganisms8081222.
367. Uppu, D.S.S.M.; Konai, M.M.; Sarkar, P.; Samaddar, S.; Fensterseifer, I.C.M.; Farias-Junior, C.; Krishnamoorthy, P.; Shome, B.R.; Franco, O.L.; Haldar, J. Membrane-active macromolecules kill antibiotic-tolerant bacteria and potentiate antibiotics towards Gram-negative bacteria. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–30, doi:10.1371/journal.pone.0183263.
368. Li, N.; Luo, M.; Fu, Y.J.; Zu, Y.G.; Wang, W.; Zhang, L.; Yao, L.P.; Zhao, C.J.; Sun, Y. Effect of corilagin on membrane permeability of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Phyther. Res.* **2013**, *27*, 1517–1523, doi:10.1002/ptr.4891.
369. Ivanov, M.; Gašić, U.; Stojković, D.; Kostić, M.; Mišić, D.; Soković, M. New evidence for *Artemisia absinthium* L. application in gastrointestinal ailments: ethnopharmacology, antimicrobial capacity, cytotoxicity, and phenolic profile. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2021**, *2021*, 1–14, doi:10.1155/2021/9961089.
370. Seukep, A.J.; Fan, M.; Sarker, S.D.; Kuete, V.; Guo, M.Q. *Plukenetia huayllabambana* fruits: Analysis of bioactive compounds, antibacterial activity and relative action mechanisms. *Plants* **2020**, *9*, 1–14, doi:10.3390/plants9091111.
371. Yang, S.K.; Yusoff, K.; Thomas, W.; Akseer, R.; Alhosani, M.S.; Abushelaibi, A.; Lim, S.H.E.; Lai, K.S. Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–14, doi:10.1038/s41598-019-55601-0.
372. El-Baky, R.M.A.; Sandle, T.; John, J.; Abuo-Rahma, G.E.D.A.; Hetta, H.F. A novel mechanism of action of ketoconazole: Inhibition of the *NorA* efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 1703–1718, doi:10.2147/IDR.S201124.
373. Barksdale, S.M.; Hrifko, E.J.; van Hoek, M.L. Cathelicidin antimicrobial peptide from *Alligator mississippiensis* has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Dev. Comp. Immunol.* **2017**, *70*, 135–144, doi:10.1016/j.dci.2017.01.011.
374. Magesh, H.; Kumar, A.; Alam, A.; Priyam; Sekar, U.; Sumantran, V.N.; Vaidyanathan, R. Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J. Exp. Biol.* **2013**, *51*, 764–772.
375. Wille, J.J.; Kydonieus, A. Palmitoleic acid isomer (C16:1Δ6) in human skin sebum is effective

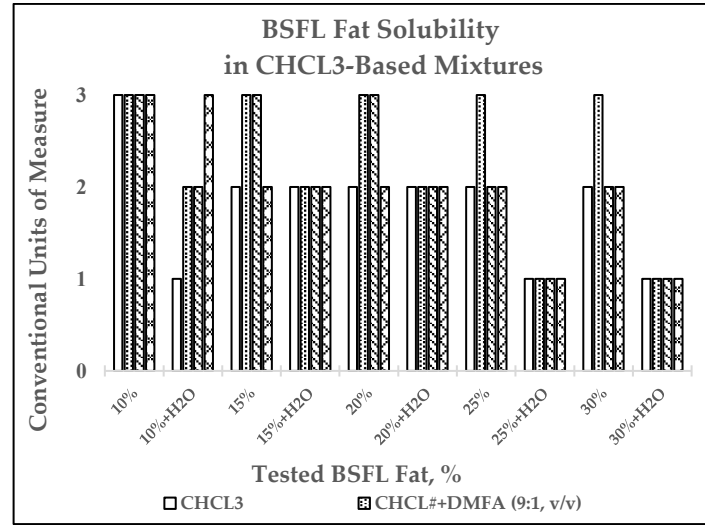
- against gram-positive bacteria. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2003**, *16*, 176–187, doi:10.1159/000069757.
376. Kim, N.; Son, J.H.; Kim, K.; Kim, H.J.; Shin, M.; Lee, J.C. DKsA modulates antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1–8, doi:10.3390/antibiotics10121472.
377. Rajendran, M.P.; Pallaiyan, B.B.; Selvaraj, N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant profile of essential oil from *Murraya koenigii* (L.) leaves. *Avicenna J. phytomedicine* **2014**, *4*, 200–14.
378. Harlystiarini, H.; Mutia, R.; Wibawan, I.W.T.; Astuti, D.A. In vitro antibacterial activity of black soldier fly (*Hermetia Illucens*) larva extracts against gram-negative bacteria. *Bul. Peternak.* **2019**, *43*, 125–129, doi:10.21059/buletinpeternak.v43i2.42833.
379. Auza, F.A.; Purwanti, S.; Syamsu, J.A.; Natsir, A. Antibacterial activities of black soldier flies (*Hermetia illucens. L*) extract towards the growth of *Salmonella typhimurium*, *E.coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2020**, *492*, 1–7, doi:10.1088/1755-1315/492/1/012024.
380. Park, S.I.; Chang, B.S.; Yoe, S.M. Detection of antimicrobial substances from larvae of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: *Stratiomyidae*). *Entomol. Res.* **2014**, *44*, 58–64, doi:10.1111/1748-5967.12050.
381. Umerska, A.; Cassisa, V.; Matougui, N.; Joly-Guillou, M.L.; Eveillard, M.; Saulnier, P. Antibacterial action of lipid nanocapsules containing fatty acids or monoglycerides as co-surfactants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *108*, 100–110, doi:10.1016/j.ejpb.2016.09.001.
382. Parsons, J.B.; Yao, J.; Frank, M.W.; Jackson, P.; Rock, C.O. Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Saphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 5294–5304, doi:10.1128/JB.00743-12.
383. Guarino, F.; Castiglione, S.; Terzaghi, M.; Krishnamoorthy, R.; Choudhury, A.R.; Walitang, D.I.; Anandham, R.; Senthilkumar, M.; Sa, T. Salt stress tolerance-promoting proteins and metabolites under plant-bacteria-salt stress tripartite interactions. *Appl. Sci.* **2022**, *Vol. 12*, Page 3126 **2022**, *12*, 1–14, doi:10.3390/APP12063126.
384. Hariharan, P.; Paul-Satyaseela, M.; Gnanamani, A. In vitro profiling of antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of thymoquinone against selected type and clinical strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *62*, 283–289, doi:10.1111/lam.12544.

385. Chusri, S.; Voravuthikunchai, S.P. Damage of Staphylococcal cytoplasmic membrane by *Quercus infectoria* G. Olivier and its components. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *52*, 565–572, doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03041.x.
386. Fei, P.; Xu, Y.; Zhao, S.; Gong, S.; Guo, L. Olive oil polyphenol extract inhibits vegetative cells of *Bacillus cereus* isolated from raw milk. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 3894–3902, doi:10.3168/jds.2018-15184.
387. Shi, C.; Song, K.; Zhang, X.; Sun, Y.; Sui, Y.; Chen, Y.; Jia, Z.; Sun, H.; Sun, Z.; Xia, X.X. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0159006.
388. Wu, S.C.; Yang, Z.Q.; Liu, F.; Peng, W.J.; Qu, S.Q.; Li, Q.; Song, X. Bin; Zhu, K.; Shen, J.Z. Antibacterial effect and mode of action of flavonoids from licorice against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–14, doi:10.3389/fmicb.2019.02489.
389. Schäfer, A.B.; Wenzel, M. A how-to guide for mode of action analysis of antimicrobial peptides. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 1–27, doi:10.3389/fcimb.2020.540898.
390. Müller, D.J.; Dufrière, Y.F. Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 461–469, doi:10.1016/j.tcb.2011.04.008.
391. Nasompag, S.; Siritongsuk, P.; Thammawithan, S.; Srichaiyapol, O.; Prangkio, P.; Camesano, T.A.; Sinthuvanich, C.; Patramanon, R. AFM study of nanoscale membrane perturbation induced by antimicrobial lipopeptide C14 kyr. *Membranes (Basel)*. **2021**, *11*, 1–16, doi:10.3390/membranes11070495.

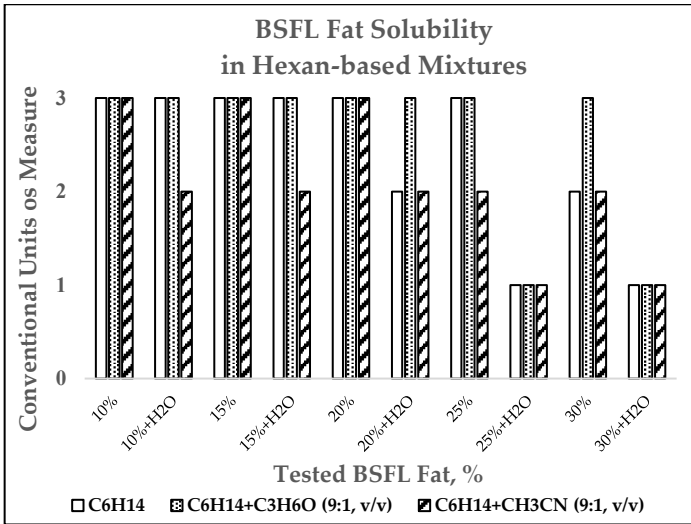
Appendix



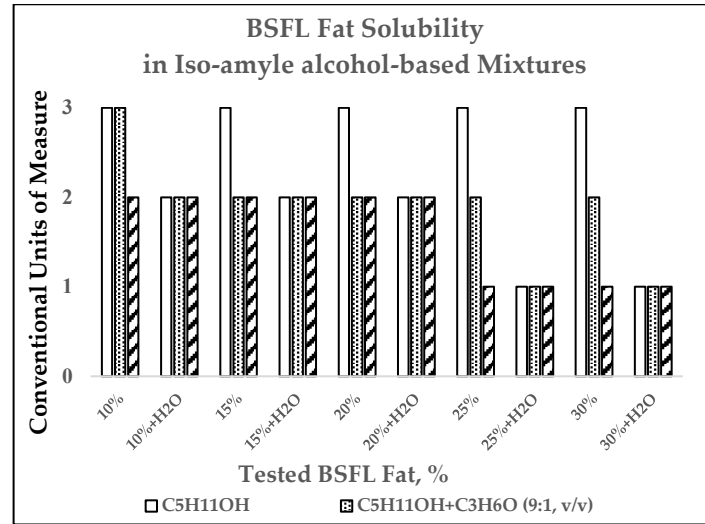
a)



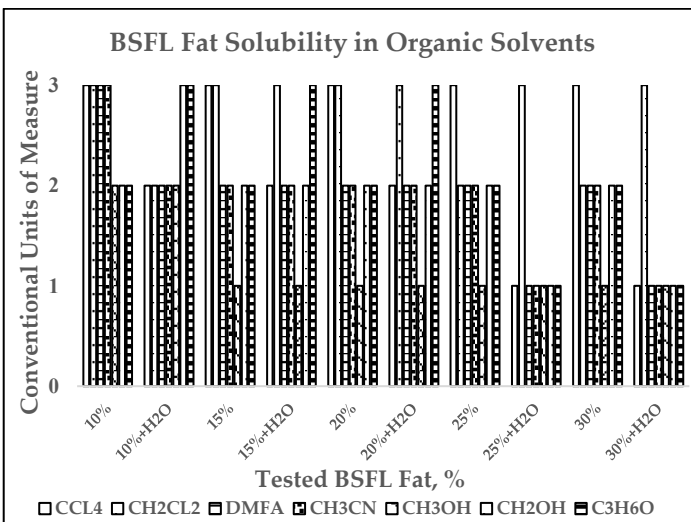
b)



c)



d)



e)

Figure S1. Assessment of BSFL fat solubility. BSFL fat solubilized in various single organic solvents or a combination of two. To increasing hydrophilicity, the organic reagents diluted in 10-fold with H₂O. The solubility of BSFL fat tested in the range of 10-30% concentration. Solubility marks: 3 units - soluble; 2 units -partially soluble; 1 unit - insoluble.

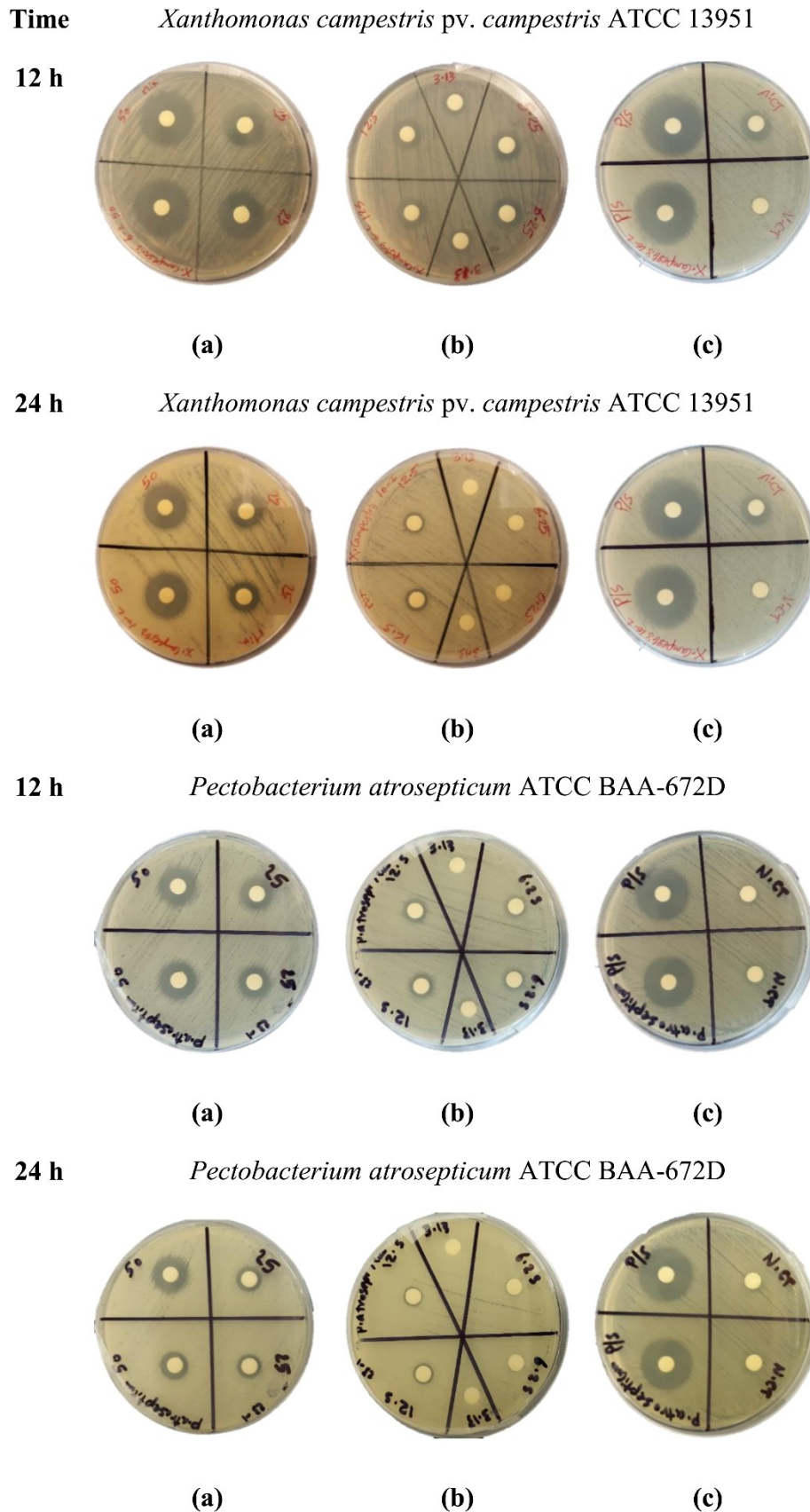


Figure S2. The disk diffusion assay. The representative images of zones of bacterial growth inhibition were measured after 12 h and 24 h of overnight incubation of the discs loaded on petri dishes agar with *Xanthomonas campestris pv campestris* ATCC 13951 and *Pectobacterium atrosepticum* ATCC BAA-672D bacteria lawn. The discs with tested samples were loaded with 50 μ L of AWME from larvae fat with concentrations of 50 and 25 mg/mL (a); 12.5, 6.25, and 3.13 mg/mL (b); 50 μ L of P/S samples with concentration 5000 U/mL–5000 μ g/mL was used as positive control (c). The 50 μ L of pure AWM extracting solution used as a negative control (N. CT) (c). All samples were loaded in duplicates.

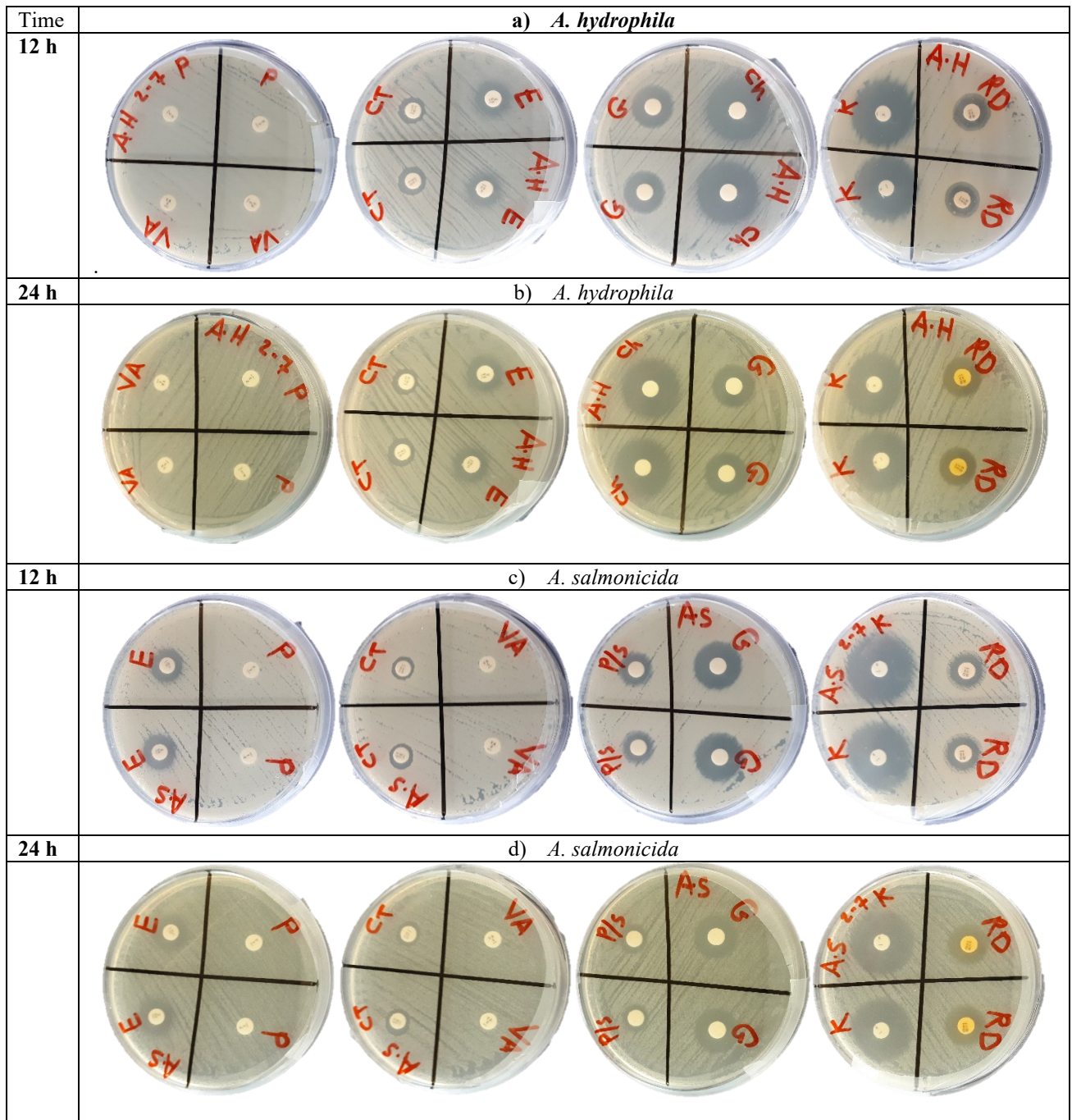


Figure S3. Resistance patterns of *Aeromonas* spp., to various classes of antimicrobial agents. Seven groups of antibiotics were tested against fish bacterial strains by the disk assay method. All antibacterial drugs were introduced to the Muller Hinton agar plates cultured with bacteria strains at density 10^8

(CFU/mL) and placed with gently pressing on the surface of the petri dishes agar. All discs were performed in duplicate and the results were the mean of $IZD \pm SD$ of three independent experiments.

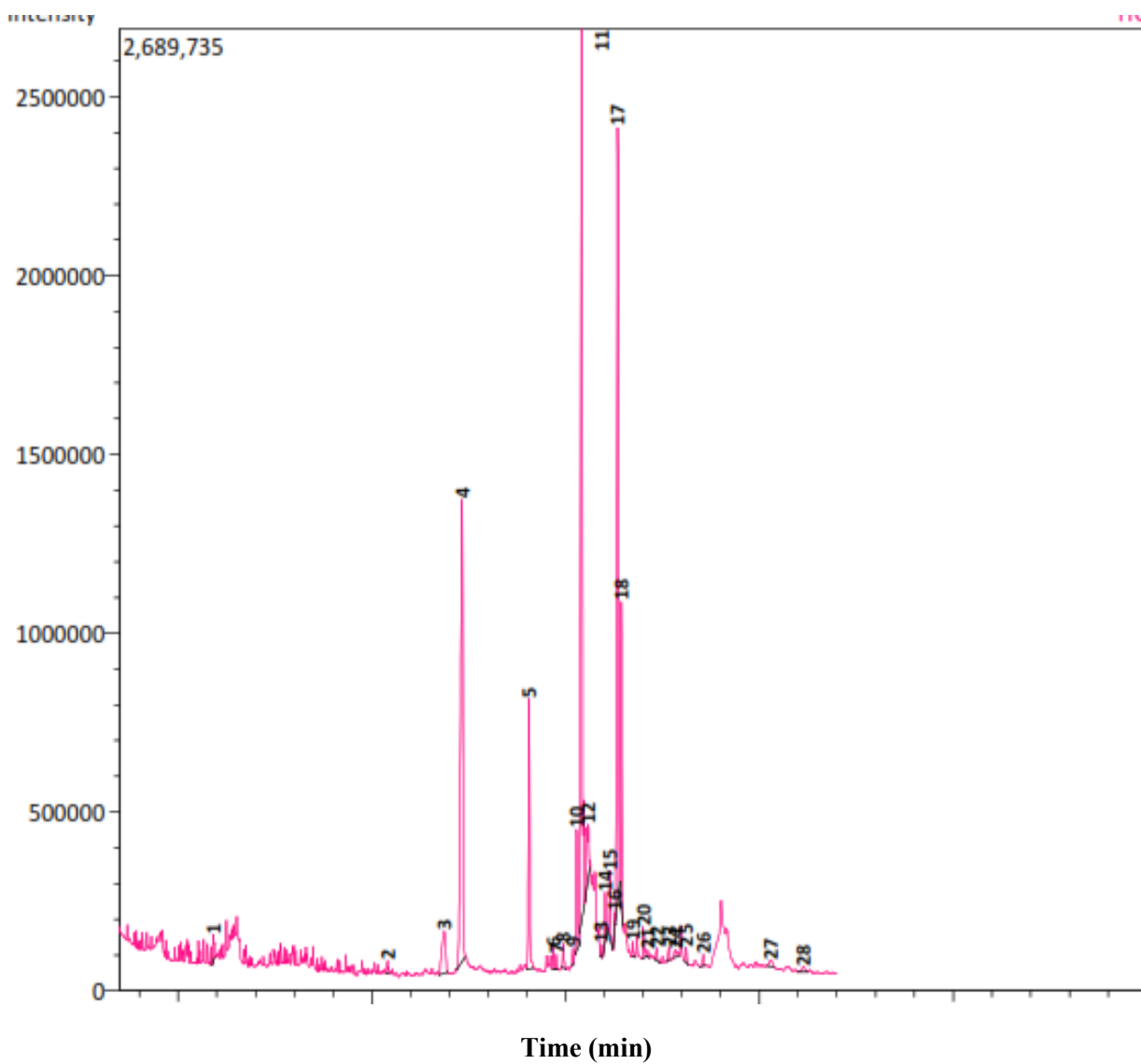


Figure S4. GC-MS chromatogram of AWME1 from BSFL fat. The chemical composition profile of 28 compounds was identified using NIST-08 library.

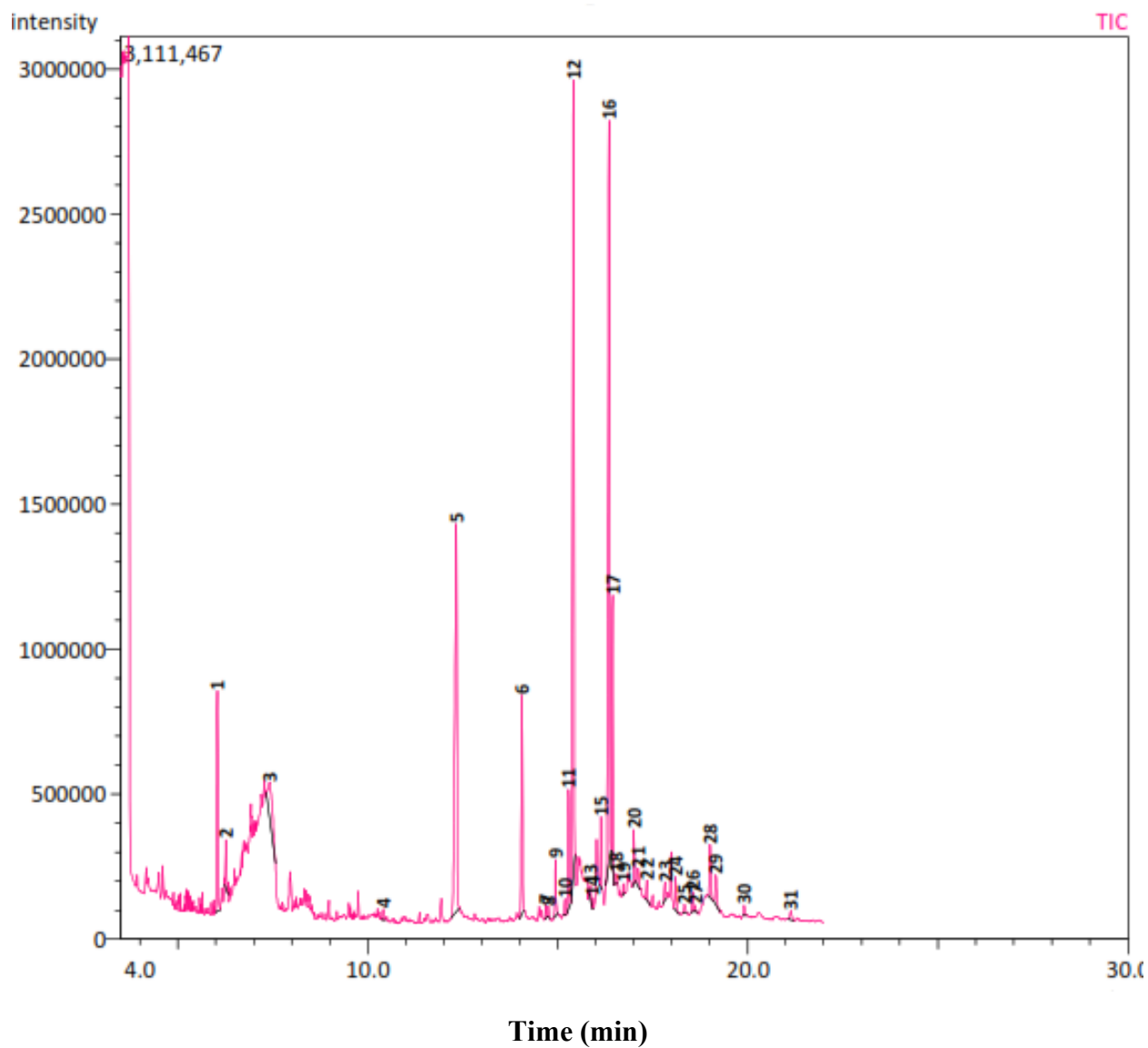


Figure S5. GC-MS chromatogram of AWME2 from BSFL fat. The chemical composition profile of 31 compounds was identified using NIST-08 library.

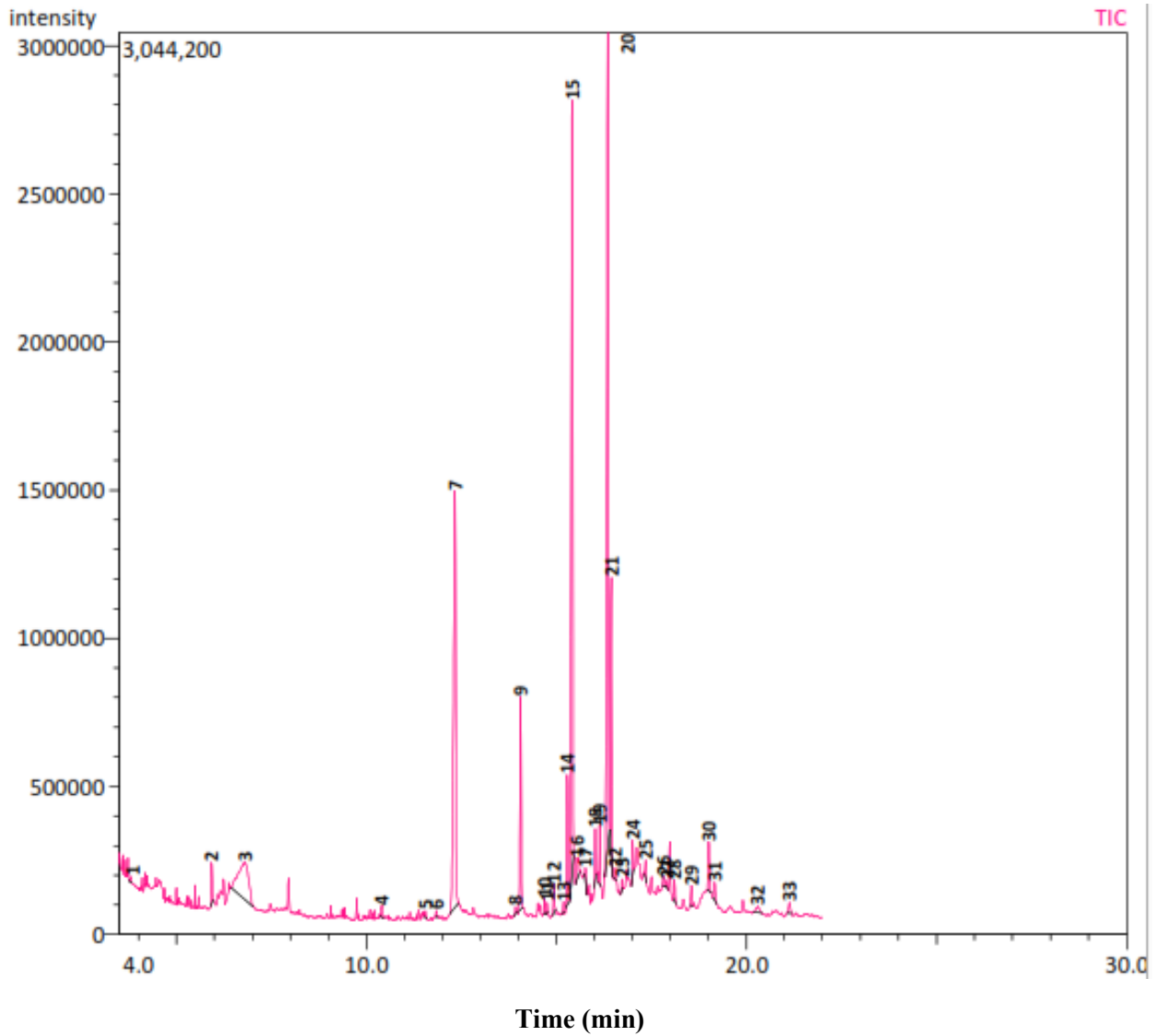
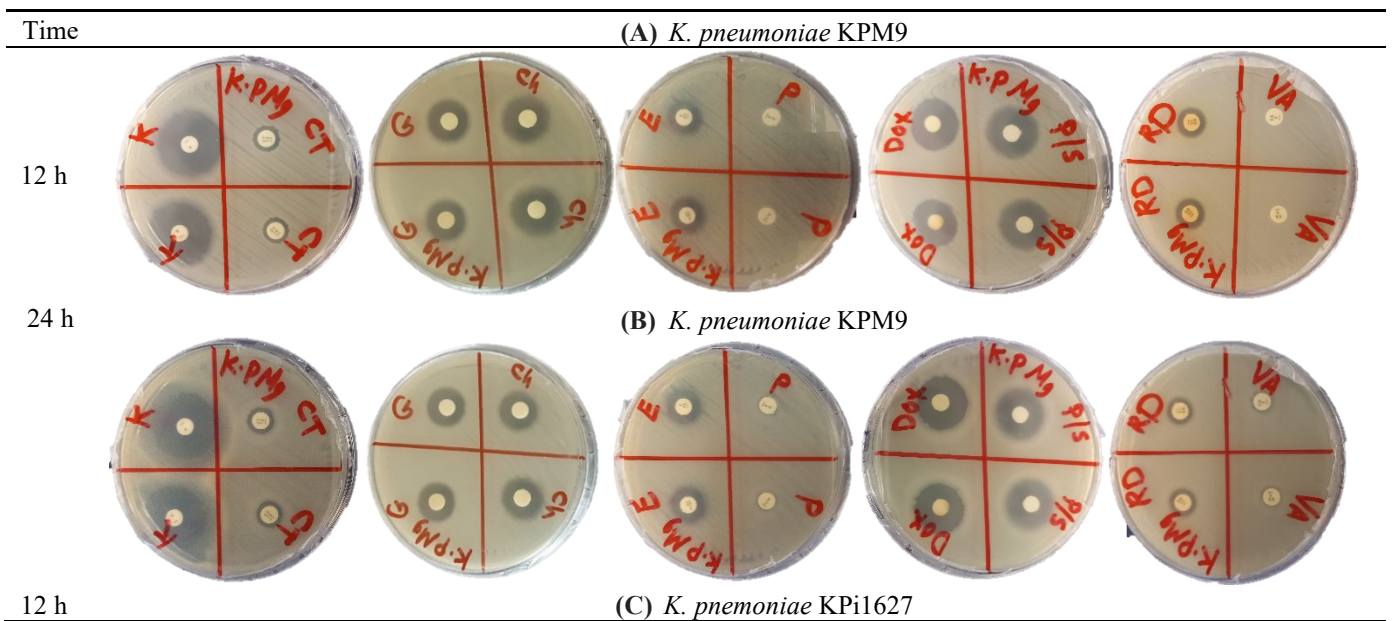


Figure S6. GC-MS chromatogram of AWME3 from BSFL fat. The chemical composition profile of 33 compounds was identified using NIST-08 library.



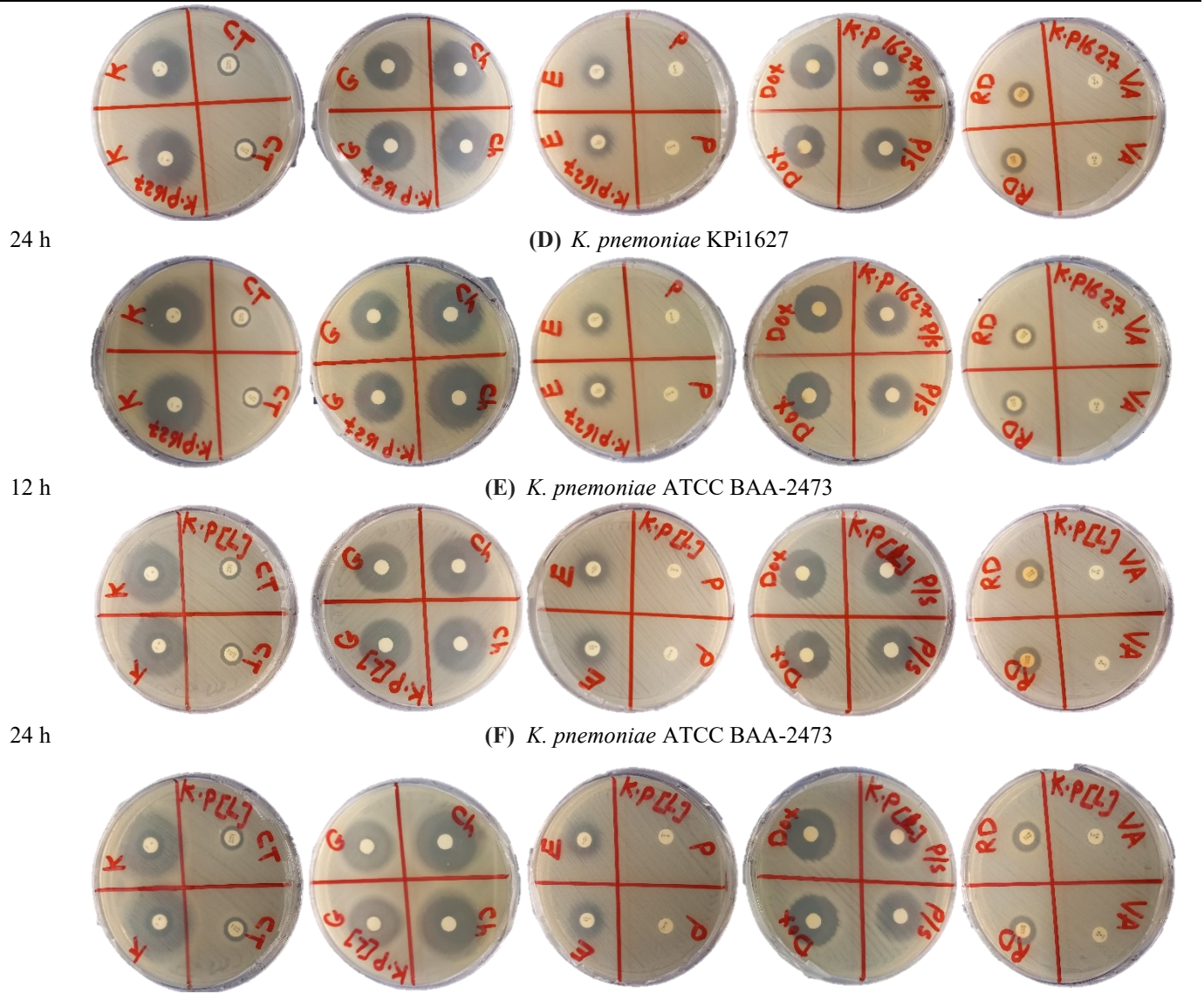


Figure S7. Susceptibility of (A, B) *K. pneumoniae* KPM9, (C, D) *K. pneumoniae* KPi1627 and (E, F) *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 against eight groups of antibiotics determined by disk diffusion assay. All antibiotics were applied to the discs and gently pressed on the surface of the Muller Hinton agar Petri dishes with cultured bacteria strains at density 10^8 (CFU/mL). All discs were placed in duplicates, and the mean of resulting IZD \pm SD of three independent experiments was estimated.

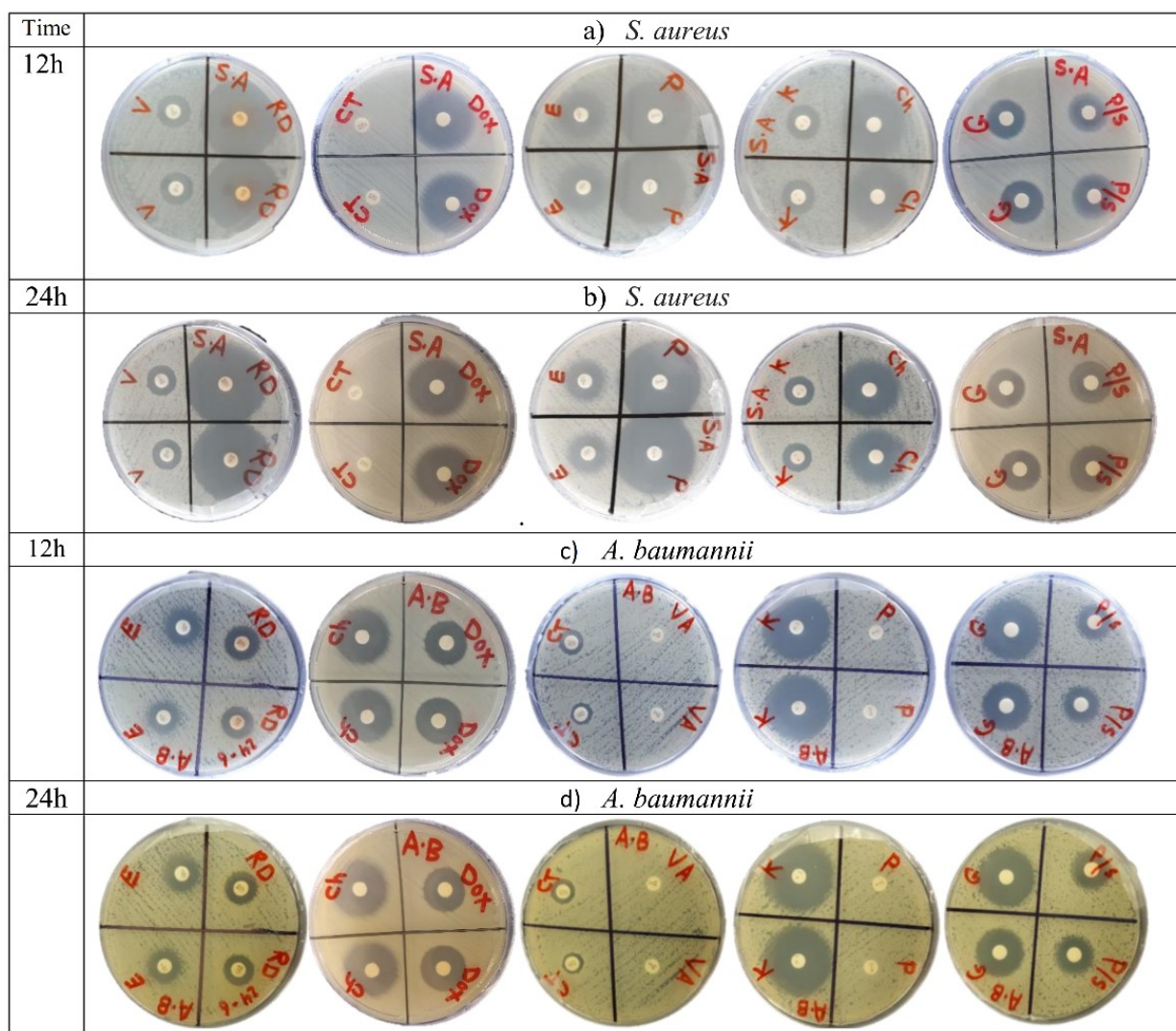


Figure S8. Susceptibility of *S. aureus* ATCC 55804 and *A. baumannii* ATCC 19606, eight groups of antibiotics determined by disk diffusion assay. All antibiotics were applied to the discs and gently pressing on the surface of the Muller Hinton agar Petri dishes with cultured bacteria strains at density 10^8 (CFU/mL). All discs were placed in duplicates, and the mean of resulting IZD \pm SD of three independent experiments was estimated.

Table S1. Chemical compositions of GC-MS analysis for AWME1 of BSFL fat.

S. No	RT	Area %	Name of the compound	Molecular formula	Mol. weight (g/mol)	Similarity %
1	5.918	0.62	1,2-Propanediol, 3-chloro-	$C_3H_7ClO_2$	110	82
2	10.405	0.31	Decanoic acid (Capric acid)	$C_{10}H_{20}O_2$	172	89
3	11.866	3.18	Beta. -D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	$C_6H_{10}O_5$	162	92
4	12.33	19.32	Dodecanoic acid (Lauric acid)	$C_{12}H_{24}O_2$	200	97
5	14.058	6.62	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	$C_{14}H_{28}O_2$	228	97
6	14.683	0.42	Dodecanoic acid, ethenyl ester	$C_{14}H_{26}O_2$	226	79
7	14.756	0.3	Pentadecanoic acid	$C_{15}H_{30}O_2$	242	86

8	14.937	0.57	Octanoic acid, 2-dimethylaminoethyl ester	$C_{12}H_{25}NO_2$	215	89
9	15.188	0.3	Hexadecanoic acid methyl ester (Palmitic acid methyl ester)	$C_{17}H_{34}O_2$	270	89
10	15.286	3.03	cis-9-Hexadecenoic acid	$C_{16}H_{30}O_2$	254	96
11	15.412	26.19	n-Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	$C_{16}H_{32}O_2$	256	96
12	15.585	3.08	Dodecanoyl chloride (Lauric acid chloride)	$C_{12}H_{23}ClO$	218	75
13	15.917	0.19	Tridecanoic acid	$C_{14}H_{28}O_2$	228	83
14	16.02	1.36	Dodecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester (Glycerol alpha monolaurate)	$C_{15}H_{30}O_4$	274	82
15	16.139	1.35	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (Methyl oleate)	$C_{19}H_{36}O_2$	296	89
16	16.258	0.37	Octadecanoic acid, methyl ester (Stearic acid methyl ester)	$C_{19}H_{38}O_2$	298	86
17	16.345	22.65	Octadec-9-enoic acid (Oleic acid)	$C_{18}H_{34}O_2$	282	95
18	16.435	5.93	Octadecanoic acid (Stearic acid)	$C_{18}H_{36}O_2$	284	93
19	16.724	0.37	9,12-Octadecadienoic acid (Z, Z)- (Linoleic acid)	$C_{18}H_{32}O_2$	280	91
20	17.003	0.82	Undecanal, 2-methyl-	$C_{12}H_{24}O$	184	82
21	17.115	0.16	Tetradecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester (Myristic acid beta mono glyceride)	$C_{17}H_{34}O_4$	302	75
22	17.347	0.34	Eicosanoic acid (Arachidic acid)	$C_{20}H_{40}O_2$	312	88
23	17.663	0.32	Oleoyl chloride (Oleic acid chloride)	$C_{18}H_{33}ClO$	300	87
24	17.824	0.35	Ethanamine, 2,2'-oxybis [N, N-dimethyl-	$C_8H_{20}N_2O$	160	80
25	18.103	0.4	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester (Palmitic acid. beta. - monoglyceride)	$C_{19}H_{38}O_4$	330	92
26	18.551	0.32	Octadecanamide	$C_{18}H_{37}NO$	283	83
27	20.299	0.39	Dodecanoic acid, 1-(hydroxymethyl)-1,2-ethanediyl ester	$C_{27}H_{52}O_5$	456	72
28	21.134	0.34	Cholesta-3,5-diene	$C_{27}H_{44}$	368	75

Table S2. Chemical compositions of GC-MS analysis for AWME2 of BSFL fat.

S. No	RT	Area %	Name of the compound	Molecular formula	Mol. weight (g/mol)	Similarity %
1	6.04	5.26	1,2-Propanediol, 3-chloro-	$C_3H_7ClO_2$	110	97
2	6.27	1.18	2-Chloro-1,3-propandiol	$C_3H_7ClO_2$	110	77
3	7.42	3.47	1,2,3-propantriol (Glycerol)	$C_3H_8O_3$	92	95
4	10.405	0.26	n-Decanoic acid (Capric acid)	$C_{10}H_{20}O_2$	172	86
5	12.33	16.68	Dodecanoic acid (Lauric acid)	$C_{10}H_{20}O_2$	200	97
6	14.058	5.56	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	$C_{14}H_{28}O_2$	228	97
7	14.684	0.25	Dodecanoic acid, ethenyl ester	$C_{14}H_{26}O_2$	226	77
8	14.755	0.2	Pentadecanoic acid	$C_{15}H_{30}O_2$	242	94
9	14.941	1.24	Octanoic acid, 2-dimethylaminoethyl ester	$C_{12}H_{25}NO_2$	215	92

10	15.188	0.32	Hexadecanoic acid, methyl ester (Palmitic acid methyl ester)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	88
11	15.286	3.05	cis-9-Hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	96
12	15.414	22.01	n-Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	96
13	15.858	0.18	Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1- (hydroxymethyl) ethyl ester	C ₁₅ H ₃₀ O ₄	274	75
14	15.918	0.18	Tridecanoic acid	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214	87
15	16.137	1.36	Dodecanoic acid, 2,3- dihydroxypropyl ester (Glycerol. alpha. -monolaurate)	C ₁₅ H ₃₀ O ₄	274	85
16	16.349	23.9	Octadec-9-enoic acid (Oleic acid)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	95
17	16.438	5.74	Octadecanoic acid (Stearic acid)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	94
18	16.538	0.22	13-Tetradec-11-yn-1-ol	C ₁₄ H ₂₄ O	208	77
19	16.724	0.21	9,12-Octadecadienoic acid (Z, Z)- (Linoleic acid)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	89
20	17.002	1.21	N1-Isopropyl-2-methyl-1,2- propanediamine	C ₇ H ₁₈ N ₂	130	83
21	17.114	0.51	Tetradecanoic acid, 2-hydroxy-1- (hydroxymethyl)ethyl ester (Myristic acid. beta. - monoglyceride)	C ₁₇ H ₃₄ O ₄	302	78
22	17.344	0.46	Eicosanoic acid (Arachidic acid)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	91
23	17.822	0.49	Octanoic acid, 2- dimethylaminoethyl ester	C ₁₂ H ₂₅ NO ₂	215	87
24	18.101	0.94	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1- (hydroxymethyl)ethyl ester (Palmitic acid. beta. - monoglyceride)	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330	95
25	18.336	0.26	9-Octadecanoic acid (Z)-	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	88
26	18.55	0.48	Tetradecanamide	C ₁₄ H ₂₉ NO	227	92
27	18.616	0.12	Tritriacontane	C ₃₃ H ₆₈	464	79
28	19.009	1.68	Oleoyl chloride	C ₁₈ H ₃₃ ClO	300	93
29	19.162	1.09	9-Octadecenoic acid, 1,2,3- propanetriyl ester, (E, E, E)-	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	884	91
30	19.906	0.27	Octadecanamide	C ₁₈ H ₃₇ NO	283	91
31	21.137	0.35	Cholesta-3,5-diene	C ₂₇ H ₄₄	368	80

Table S3. Chemical compositions of GC-MS analysis for AWME3 of BSFL fat.

S. No	RT	Area %	Name of the compound	Molecular formula	Mol. weight (g/mol)	Similarity %
1	3.798	0.11	2-Propanone, 1-hydroxy-	C ₃ H ₆ O ₂	74	83
2	5.928	0.85	1,2-Propanediol, 3-chloro- (Glycerol. alpha. -chlorohydrin)	C ₃ H ₇ ClO ₂	110	94
3	6.808	7.87	1,2,3-propanetriol (Glycerol)	C ₃ H ₈ O ₃	92	96
4	10.403	0.3	n-Decanoic acid (Capric acid)	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	84
5	11.552	0.11	Benzene, octyl-	C ₁₄ H ₂₂	190	82
6	11.84	0.14	Beta. -D-Glucopyranose, 1,6- anhydro- (Levoglucozan)	C ₆ H ₁₀ O ₅	162	77
7	12.331	17.66	Dodecanoic acid (Lauric acid)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200	97
8	13.923	0.13	2,4-Dodecadienal, (E, E)-	C ₁₂ H ₂₀ O	180	80

9	14.058	5.27	Tetradecanoic acid (Myristic acid)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	97
10	14.683	0.27	Dodecanoic acid, ethenyl ester	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226	77
11	14.753	0.2	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	91
12	14.936	0.64	3-Cyclopentylpropionic acid, 2-dimethylaminoethyl ester	C ₁₂ H ₂₃ NO ₂	213	92
13	15.187	0.23	Hexadecanoic acid, methyl ester (Palmitic acid methyl ester)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	88
14	15.286	3.15	cis-9-Hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	96
15	15.413	21.76	n-Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	96
16	15.55	0.97	Dodecanoyl Chloride (Lauric acid chloride)	C ₁₂ H ₂₃ ClO	218	75
17	15.761	0.21	Cholest-5-en-3-ol (3. beta.)-, carbonochloridate (Cholesterol, chloroformate)	C ₂₈ H ₄₅ ClO ₂	448	76
18	16.021	1.08	Dodecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester (Lauric acid. beta. -monogly)	C ₁₅ H ₃₀ O ₄	274	82
19	16.137	1.14	Oxiraneundecanoic acid, 3-pentyl-, methyl ester, cis-	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	312	85
20	16.35	26.28	Octadec-9-enoic acid (cis-oleic acid)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	95
21	16.439	5.82	Octadecanoic acid (Stearic acid)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	94
22	16.542	0.25	9,12-Hexadecadienoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	266	78
23	16.723	0.21	9,12-Octadecadienoic acid (Z, Z)- (Linoleic acid)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	91
24	17.004	0.86	Undecanal, 2-methyl-	C ₁₂ H ₂₄ O	184	81
25	17.345	0.31	Eicosanoic acid (Arachidic acid)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	90
26	17.82	0.23	Octanoic acid, 2-dimethylaminoethyl ester	C ₁₂ H ₂₅ NO ₂	215	82
27	17.901	0.13	cis-9-Hexadecenal	C ₁₆ H ₃₀ O	238	83
28	18.101	0.49	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330	95
29	18.55	0.46	Octadecanamide	C ₁₈ H ₃₇ NO	283	92
30	19.01	1.46	Oleoyl chloride (Oleic acid chloride)	C ₁₈ H ₃₃ ClO	300	92
31	19.163	0.61	9-Octadecenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester, (E, E, E)-	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	884	89
32	20.3	0.44	Octadecanoic acid, 2,3-bis[(1-Oxotetradecyl) Oxy] propyl ester	C ₄₉ H ₉₄ O ₆	778	77
33	21.136	0.36	Cholesta-3,5-Diene	C ₂₇ H ₄₄	368	90

МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
(НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Мохамед Хекаль Абдельхаким Абдельазиз

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ
ЖИРА ЛИЧИНОК МУХИ ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА (*HERMETIA ILLUCENS*) И ОБОСНОВАНИЕ
ПЕРСПЕКТИВ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ И ЗАЩИТЕ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР**

Научная специальность 1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

Кандидата биологических наук

Перевод с английского

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Марусич Елена Ивановна

Москва

2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	230
Глава 1. Обзор литературы	240
1.1. Муха <i>Hermetia illucens</i>	240
1.1.1. Классификация и жизненный цикл <i>Hermetia illucens</i>	240
1.1.2. Важность личинок <i>H. illucens</i>	241
1.1.3. Влияние субстрата для выращивания на состав жирных кислот ЛМЧЛ.....	242
1.1.4. Влияние процедур экстракции на жирно кислотный состав личинок <i>H. illucens</i>	245
1.1.5. Формирование дисперсионных систем путем экстракции жира личинок <i>H. Illucens</i>	247
1.1.6. Классификация липидов и жирных кислот.....	248
1.2. Антибиотики.....	249
1.2.1. Антибиотики как антибактериальные средства.....	249
1.2.2. Устойчивость к антибиотикам.....	250
1.2.3. Причины устойчивости к антибиотикам.....	250
1.2.4. Механизмы устойчивости к антибиотикам.....	251
1.3. Жирные кислоты как природные биологически активные вещества.....	253
1.3.1. Спектр антибактериальной активности жирных кислот.....	253
1.3.2. Механизмы антибактериальной активности жирных кислот.....	257
1.3.2.1. Проницаемость мембран и лизис клеток.....	257
1.3.2.2. Разрушение цепи переноса электронов и расцепление окислительного Фосфорилирования.....	260
1.3.2.3. Ингибирование активности бактериальных ферментов.....	261
1.3.2.4. Перекисное и автоокисление.....	262
1.4. Жирные кислоты разрушают биопленки патогенных бактерий.....	262
1.5. Жирные кислоты борются с наиболее важными фитопатогенными бактериями при защите сельскохозяйственных культур.....	263
1.6. Использование личинок <i>H. illucens</i> в аквакультуре и ветеринарии.....	266
1.7. Жир личинок <i>H. illucens</i> уничтожает штаммы патогенных бактерий МЛУ человека.....	272
1.8. Цитотоксичность жирных кислот.....	273
Глава 2. Экспериментальные методы исследования	274
2.1. Биологические материалы.....	274
2.2. Химические реагенты.....	274
2.3. Питательные среды.....	275
2.4. Условия культивирования бактерий.....	276
2.5. Экстракция жира из личинок <i>H. Illucens</i>	276

2.6. Определение антимикробных свойств экстрактов из жира личинок <i>H. illucens</i>	277
2.6.1. Анализ диффузии агарового диска.....	277
2.6.2. Турбидиметрический анализ.....	277
2.6.3. Определение минимальной концентрации подавления (МПК) с помощью турбидиметрического анализа.....	278
2.6.4. Определение половины подавления концентрации (МПК50).....	278
2.6.5. Определение минимальной бактерицидной концентрации (МБК).....	278
2.7. Оценка множественной лекарственной устойчивости.....	279
2.8. Анализ бактериальной устойчивости	279
2.9. Анализ биопленки <i>K. pneumoniae</i>	280
2.9.1. Образование биопленки.....	280
2.9.2. Анализ автоагрегации	280
2.9.3. Анализы вязкости, нитевидности и осаждения.....	280
2.9.4. Испытание на гидрофобность	281
2.10. Проверка факторов вирулентности бактерий с помощью анализов на подвижность	281
2.10.1. Роевая подвижность.....	281
2.10.2. Плавательная подвижность	282
2.10.3. Подергивающаяся подвижность	282
2.11. Ингибирование образования биопленки с помощью КВМЭЗ.....	282
2.12. Ингибирование зрелых биопленок, образованных штаммами <i>K. pneumoniae</i> , с присутствии КВМЭЗ.....	283
2.13. Ингибирование смешанных биопленок, образованных штаммами <i>K. pneumoniae</i> , прнсутствии КВМЭЗ.....	284
2.14. Разрушение мембраны <i>K. pneumoniae</i> с помощью КВМЭЗ.....	284
2.14.1. Относительная электропроводность.....	284
2.14.2. Анализ поглощения кристаллического фиолетового	285
2.14.3. Поглощение бромистого этидия	285
2.15. Разрушение биопленки с помощью КВМЭЗ, визуализированное с помощью методов микроскопии.....	286
2.15.1. Световая микроскопия.....	286
2.15.2. Флуоресцентная микроскопия.....	286
2.15.3. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	287
2.16. Газовая хроматография-масс спектрометрия (ГХ-МС) анализа КВМЭ.....	287

2.17. Механизм антибактериального действия КВМЭЗ в отношении штаммов МЛУ <i>S. aureus</i> АТСС 55804 и <i>A. baumannii</i> АТСС 19606.....	288
2.17.1. Морфологические изменения бактерий, визуализированные с помощью СЭМ-микроскопии после обработки КВМЭЗ.....	288
2.17.2. Изменение компартментов бактериальных клеток, визуализированное с помощью просвечивающей электронной микроскопии	289
2.17.3. Изменения размеров бактериальных клеток, определяемые методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).....	289
2.17.4. Тест на солеустойчивость	290
2.17.5. Тест на время убивания	290
2.17.6. Анализ утечки цитоплазматического содержимого.....	291
2.17.7. Тест Алмар синий	291
2.17.8. Анализ внутриклеточного АТФ	292
2.17.9. Анализ поглощения йодида пропидия (ПЙ-поглощение).....	293
2.18. МТТ тест на цитотоксичность	293
2.19. Статистическая обработка результатов.....	294
Глава 3. Жир личинок <i>Hermetia illucens</i> подавляет и уничтожает фитопатогенные бактерии	295
3.1. Биологически активные соединения, экстрагированные из жира личинок <i>H. illucens</i>	295
3.2. Измерение диаметра зоны ингибирования с помощью дискового диффузионного анализа.....	298
3.3. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) КВМЭ экстракта.....	300
3.4. Значения концентрации КВМЭ для 50%-ного подавляющая (МПК50), эффективной против патогенных бактерий растений.....	302
3.5. Влияние КВМЭ из жира личинок на кривые роста бактерий.....	303
3.6. Анализ экстракта КВМЭ методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС).....	306
Глава 4. Последовательные экстракты жира личинок <i>H. illucens</i> уничтожают патогенные рыбные бактерии.....	314
4.1. Тестирование на чувствительность к антибиотикам.....	314
4.2. Последовательная экстракция жира ЛМЧЛ.....	316
4.3. Тестирование антибактериальной чувствительности <i>Aeromonas</i> spp. к результатам ПЭ.....	317
4.4. КВМЭЗ демонстрирует дозозависимую антимикробную активность.....	320
4.5. Тестирование антибактериальной чувствительности <i>Aeromonas</i> spp. к ПЭ с помощью анализов МПК и МБК.....	322
4.6. МПК50 и кривые роста с КВМЭЗ против <i>Aeromonas</i> spp.....	325

4.7. ГХ-МС-анализ последовательных экстрактов из жира ЛМЧЛ.....	329
Глава 5. Влияние экстракта жира личинок <i>H. illucens</i> КВМЭЗ на ШЛУ и МЛУ патогенные бактерии человека и эукариотические клетки ЭПЧ-293.....	338
5.1. Оценка МЛУ штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> человека.....	338
5.2. Антибактериальная активность КВМЭЗ в отношении штаммов <i>K. pneumoniae</i>	343
5.3. Определение значений МПК50 экстракта КВМЭЗ против штаммов <i>K. pneumoniae</i>	349
5.4. Оценка устойчивости бактериальных патогенов человека к воздействию КВМЭЗ	351
5.5. Цитотоксичность КВМЭЗ.	352
Глава 6. КВМЭЗ из жира личинок <i>H. illucens</i> повреждать и уничтожает биопленки, образованные штаммами гипермуковиск <i>K. pneumoniae</i>.....	354
6.1. Образование биопленки.....	354
6.2. Влияние КВМЭЗ на факторы образования биопленки.....	355
6.2.1. Анализы агрегации и осаждения.....	355
6.2.2. Тест на образование нити	356
6.2.3. Анализ гидрофобности.....	358
6.2.4. Влияние КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ на подвижность штаммов <i>K. pneumoniae</i>	360
6.3. Уничтожение одиночной и смешанной биопленки, образованной штаммами МЛУ <i>K. pneumoniae</i>	363
6.4. КВМЭЗ уничтожает зрелые биопленки, образованные штаммами МЛУ <i>K. pneumoniae</i>	366
6.5. Проницаемость мембраны бактериальной клетки под действием КВМЭЗ.....	368
6.5.1. Проницаемость мембран бактериальных клеток.....	368
6.5.2. Поглощение кристаллического фиолетового.....	370
6.5.3. Поглощение бромида этидия.....	371
6.6. Разрушенная зрелая биопленка, наблюдаемая с помощью световой микроскопии	373
6.7. Флуоресцентная микроскопия с иодидом пропидия.....	374
6.8. Разрушенная биопленка, визуализируемая с помощью СЭМ.....	375
Глава 7. Потенциальный механизм действия КВМЭЗ против МЛУ-патогенных бактерий человека.....	378
7.1. Паттерны интимикробной чувствительности и оценка МЛУ к патогенным бактериям человека	378
7.2. Антибактериальная активность КВМЭЗ в отношении штаммов МЛУ <i>S. aureus</i> ATCC 55804 и <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	379
7.3. Бактерицидная активность КВМЭЗ в отношении штаммов патогенных бактерий человека с МЛУ	383
7.4. Влияние КВМЭЗ на кривые роста бактерий.....	384
7.5. Выяснение жизнеспособности бактериальных клеток с помощью оценки МПК50.....	386

7.6. Исследование кривых времени уничтожения	388
7.7. Влияние солеустойчивости.....	390
7.8. Оценка целостности мембраны бактериальной клетки.....	393
7.9. Утечка клеточного цитоплазматического материала.....	395
7.10. Внутриклеточная утечка АТФ.....	396
7.11. Изменение морфологии клеток штаммов <i>S. aureus</i> ATCC 55804 и <i>A. baumannii</i> ATCC 19606, обработанных КВМЭЗ.....	397
7.12. Изменения клеточных компартментов штаммов <i>S. aureus</i> ATCC 55804 и <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 после воздействия КВМЭЗ.	402
7.13. Атомно-силовая микроскопия.....	405
7.13.1. АСМ изображения контрольных клеток <i>S. aureus</i> ATCC 55804.....	406
7.13.2. АСМ изображения клеток <i>S. aureus</i> ATCC 55804, обработанных КВМЭЗ в низких концентрациях.....	407
7.13.3. Уменьшение размеров клеток <i>S. aureus</i> ATCC 55804 при обработке КВМЭЗ.....	410
7.13.4. Изменение значений шероховатости бактериальной поверхности (Ra) и среднеквадратичного значения шероховатости (RMS).....	410
7.13.5. Изменения морфологических параметров клеток <i>S. aureus</i> ATCC 55804.....	411
7.13.6. АСМ изображения контрольных клеток <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	412
7.13.7. Влияние низких концентраций КВМЭЗ на морфологию клеток <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.	415
7.13.8. Влияние высоких концентраций КВМЭЗ на морфологию клеток <i>A. baumannii</i> ATCC 19606.....	416
Основные результаты и выводы	419
Список сокращений и условных обозначений.....	423
Признание.....	427
Список литературы.....	428
Приложение.....	467

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Тема диссертации актуальна для получения природных биоактивных соединений, выделенных из жира личинок *Hermetia illucens*, которые способны уничтожить устойчивые к лекарственным препаратам бактерии, широко распространенные в сельском хозяйстве, медицине и ветеринарии. Многие штаммы бактерий ответственны за возникновение ряда заболеваний по всему миру; эти заболевания широко распространены среди растений, животных и людей. Растительные патогенные бактерии, включая *Dickeya* spp., *Pectobacterium* spp., *Pantoea* spp., *Agrobacterium* spp., и *Xanthomonas* spp. Эти виды вызывают серьезные инфекции и болезни, которые способны убивать растительные клетки или ткани, вызывая большие потери в экономике урожая [1].

Аквакультура является обширным разделом ветеринарии, который сталкивается с рядом проблем, в частности с возникновением различных заболеваний рыб, при которых бактерии являются основным патогеном рыбы, вызывающим смертность и экономические потери производительности в аквакультуре. *Aeromonas* spp. являются наиболее распространенными бактериями для обитателей пресных и соленых вод часто вызывающими тяжелые инфекции у культивируемых видов рыб. При употреблении зараженной рыбы бактерии или токсины могут передаваться человеку, вызывая тяжелые заболевания желудочно-кишечного тракта, почек, репродуктивной системы, сердечно-сосудистой системы и других. Виды *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida* и *A. veronii* вызывают ряд заболеваний у многих видов рыб, таких как вьюн (*Misgurnus anguillicaudatus*), канальный сом (*Ictalurus punctatus*), атлантический лосось (*Salmo salar*) и обыкновенный карп (*Cyprinus carpio*) [2,3].

Внутрибольничные инфекции связаны с различными токсинами или инфекционными агентами, которые вызывают инфекцию у пациентов, поступивших в больницу. Эти инфекции в основном распространяются через границы больницы во время пребывания пациента в больнице или даже от здоровых людей. Внутрибольничные бактерии включают *Enterococcus* spp, *S. aureus*, *Klebsiella* spp, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. Известны как организмы “ESKAPE”. Эти организмы или супербактерии возвращаются в новых формах, и становятся устойчивыми почти ко всем клинически значимым противомикробным препаратам. Восемьдесят процентов внутрибольничных инфекций формируются в виде внутрибольничной пневмонии, внутрибольничных инфекций мочевыводящих путей, внутрибольничных инфекций в местах хирургических вмешательств и внутрибольничных инфекций кровотока [4,5].

В нескольких недавних исследованиях сообщалось о появлении бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) различного происхождения, включая

людей, птиц, крупный рогатый скот и рыбу, что увеличивает потребность в новых мощных и безопасных противомикробных препаратах. Кроме того, рутинное применение тестирования на чувствительность к противомикробным препаратам для выявления антибиотика выбора, а также скрининг новых штаммов МЛУ [6]. По мере роста резистентности и вирулентности увеличиваются затраты и нагрузка на общество, а разрушительные последствия устойчивости к противомикробным препаратам уже проявляются во всем мире. Инфекции, устойчивые к противомикробным препаратам, в настоящее время уносят по меньшей мере 50 000 жизней ежегодно только в Европе и США, и еще многие сотни тысяч умирают в других регионах мира. Последние данные свидетельствуют о том, что к 2050 году лекарственно-устойчивые инфекции могут ежегодно убивать дополнительно 10 миллионов человек по всему миру, если с ними не бороться [7]. Кроме того, эти виды создают устойчивые биопленки, для устранения которых требуется разработка новых терапевтических средств.

В настоящее время стандартными методами лечения бактериальной инфекции в трех областях (сельское хозяйство, ветеринария, медицина) являются антибиотики, вакцины и химические методы лечения. Тем не менее, эти методы лечения имеют ограничения в применении, побочные эффекты, низкую эффективность и образование устойчивых к антибиотикам бактерий.

N. illucens, которые являются многообещающим насекомым с высоким уровнем устойчивости, производящим экологически чистые биомолекулы с высокой биологической и экономической ценностью, включая белки и липиды, в избытке содержащиеся в его личинках. Производство антимикробных пептидов в достаточных количествах для использования в качестве терапевтических средств обходится дорого по сравнению с антимикробными липидами, которые в избытке содержатся во многих природных источниках (насекомые, растения, морские организмы) и проявляют широкий спектр и сильную антимикробную активность [8]. Антибактериальные свойства жирных кислот (ЖК) известны уже давно. Несколько исследований новых противомикробных агентов привели к тому, что ЖК стали рассматривать как антибиотики следующего поколения для борьбы с бактериями МЛУ, кроме того, растения, водоросли и животные вырабатывают ЖК для защиты от патогенов [9].

Следовательно, при острой потребности в безопасных природных противомикробных агентах для борьбы с МЛУ-бактериями, ЖК и их производные, экстрагированные и эфирные из жира личинок *N. illucens*, считаются устойчивыми биологически активными соединениями с высокой эффективностью и терапевтическим применением в нескольких подходах. Наиболее важным в этом исследовании является то, что штаммы МЛУ-бактерий не вызывали резистентности к соединениям ЖК, это проложит путь и откроет двери для того, чтобы эти биоактивные молекулы стали альтернативой антибиотикам, борясь с супербактериями во

многих областях, включая медицину, ветеринарию и сельское хозяйство [10]. Кроме того, ЖК доказал высокую эффективность в уничтожении не только планктонных патогенных клеток *МЛУ*, но также разрушал и уничтожал прилипшие клетки в биопленках. Изучение механизма антибактериального действия ЖК против широкого спектра микробов эффективно мотивирует исследователей и микробиологов к пониманию реальных взаимодействий между бактериями и живыми организмами для разработки потенциального средства для лечения, снижения вирулентности и патогенности этих серьезных микробов.

Цели и задачи настоящего исследования

Целью данного исследования является – экстракция биологически активных соединений в дисперсионных эмульсионных системах из жира личинок *H. illucens*, идентификация и характеристика жирных кислот и их производных против фитопатогенных бактерий МЛУ, патогенных бактерий, в ветеринарии внутрибольничных бактерий человека и бактериальных биопленок.

Основной задачей этого исследования является изучение роли и механизма действия биологически активных соединений, в частности жирных кислот и их производных, которые были выделены из жира личинок *H. illucens*, против штаммов бактерий МЛУ.

Для достижения этой цели были решены следующие задачи:

1. Разработать и сформулировать экстракционный раствор для извлечения свободных жирных кислот (СЖК) с помощью дисперсионных систем из жира личинок *H. illucens*.
2. Идентифицировать и охарактеризовать содержание жировых экстрактов личинок *H. illucens* (кислые водно-метанольные экстракты - КВМЭ).
3. Оценить антимикробную активность ЖК и их производных, находящихся в обилие в экстрактах КВМЭ, против фитопатогенов, и их способность к защите сельскохозяйственных культур.
4. Оценить антимикробную активность ЖК и их производных в экстракте КВМЭЗ против заболеваний *Aeromonas* и его перспективы для лечения микробных инфекций в аквакультуре.
5. Оценить антимикробную активность ЖК и их производных в экстракте КВМЭЗ против патогенов человека, и перспективы их использования в медицине для искоренения внутрибольничных бактериальных инфекций.
6. Молекулярно-биологические исследования механизма антимикробной активности ЖК и их производных из экстракта КВМЭЗ в отношении широкого спектра бактериальных патогенов.
7. Изучите влияние ЖК и их производных в КВМЭЗ на разрушение бактериальных биопленок, созданных различными гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae*.
8. Изучение влияния ЖК и их производных в КВМЭЗ на ингибирование факторов вирулентности бактерий, включая подвижность, адгезию и вязкость слизистой оболочки.

9. Изучение устойчивости, индуцированной различными бактериальными патогенами к ЖК и их производным в КВМЭЗ, по сравнению с различными антибиотиками.
10. Исследование биобезопасности использования ЖК и их производных в КВМЭЗ для человека на основе оценки цитотоксичности в отношении нормальных клеток эмбриональная почка человека (ЭПЧ-293) почек человека.

Научная новизна работы заключается в том, что

1. Впервые был разработан экстракционный раствор для биоактивных соединений, выделенных из жира личинок *H. illucens*, который состоит из дистиллированной воды, метанола и соляной кислоты в соотношении 90:9:1 (об/об).
2. Был разработан новый протокол для извлечения и выделения устойчивых биологически активных веществ из жира личинок *H. illucens* (экстракты КВМЭ) с помощью эмульсии дисперсионных систем.
3. Наше исследование впервые было сосредоточено на содержании свободных жирных кислот (СЖК) в экстракте КВМЭЗ из жира личинок *H. illucens* в качестве основных антибактериальных агентов против патогенных грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий.
4. Разработка процедуры последовательной экстракции позволила обогатить и усилить активность КВМЭ, выделенных из жира личинок *H. illucens*, против всех протестированных патогенных бактерий.
5. Впервые было продемонстрировано, что процентное содержание олеиновых кислот, цис-изомеров, увеличенное при последовательной экстракции, может проложить путь для использования масла личинок *H. illucens* в качестве устойчивой биомассы с целью практического применения в перспективе их использования в медицине, ветеринарии и защите растений.
6. Наши результаты показали, что различные штаммы МЛУ-бактерий не вызывали какой-либо устойчивости к ЖК и другим производным в экстракте КВМЭЗ, в то время как высокая устойчивость индуцировалась к различным классам антибиотиков.
7. Впервые была продемонстрирована способность КВМЭ уничтожать биопленки, образованные некоторыми смертоносными бактериями.
8. Механизм противомикробном действии ЖК и их производных в КВМЭ был впервые продемонстрирован с помощью ряда биологических тестов на клеточном и молекулярном уровнях, включая деградацию клеточной стенки, клеточной мембраны, белкового и генетического материалов, а также утечку ионов на основе различных методов микроскопии, таких как сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

9. КВМЭЗ был впервые протестирован против клеточных линий почек человека ЭПЧ-293 и продемонстрировал высокую селективность в уничтожении МЛУ-бактерий без уничтожения ЭПЧ-293.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты этого исследования способствуют расширению теоретических знаний, связанных с биохимией и микробиологией молекул ЖК, в то время как разработка состава экстракционного раствора расширит наши знания до понимания механизма химических реакций, протекающих между маслом личинки мухи Черная львица ЛМЧЛ) и кислотно-водно-метанольным реагентом. Методы последовательной экстракции СЖК и их эфиров, представленные в данной работе, могут быть использованы при производстве большого количества биологически активных соединений из жира ЛМЧЛ, образующегося в эмульсии дисперсионных систем. Открытие рецептуры экстракта КВМЭЗ с помощью дисперсионных систем, выделенных из масла ЛМЧЛ, может способствовать лучшему пониманию роли ЖК и сложных эфиров ЖК в ингибировании и уничтожении штаммов патогенных бактерий. Кроме того, полученные результаты могут иметь важное значение для понимания механизмов разрушения и уничтожения штаммов МЛУ-бактерий, распространенных в сельскохозяйственных культурах, аквакультурах и у человека *in vitro* и *in vivo*, с помощью ЖК и их производных

Практическая значимость работы заключается в том, что научно обоснованные данные могут быть применены в сельском хозяйстве, промышленности и медицине, где методом последовательной экстракции получают большое количество СЖК и глицерина, которые можно фракционировать в дисперсионных системах. СЖК глицериды и глицерин могут быть использованы во многих индустриальных применениях, включая косметику, пищевые добавки и другие. Кроме того, они могут быть эффективными терапевтическими средствами для уничтожения планктонных фитопатогенных, рыбопатогенных бактерий и патогенов человека, или вастериальных клеток в биопленках, образованных патогенными МЛУ штаммами человека, в целях широкого применения в секторе здравоохранения. Эти результаты могут быть использованы для более рационального проектирования новых натуральных лекарственных средств на основе комбинации жирных кислот и их производных для их конкретного применения в медицине, ветеринарии и защите растений.

Методология и методы исследования

В работе этого исследования используются передовые методы микробиологии, биохимии, молекулярной и клеточной биологии, а также методы аналитической химии. Методология применялась в соответствии с целями каждого этапа диссертационного исследования. Объектами исследования были жир личинок *H. illucens*, МЛУ-штаммы фитопатогенных бактерий,

патогенные бактерии рыб, патогенные бактерии человека и клетки ЭПЧ-293 почек человека. Экстракцию и отделение биоактивных молекул из липидной части личинок *H. illucens* проводили с использованием различных методов экстракции и очистки. Выделение и определение СЖК, состоящих из жирных экстрактов личинок *H. illucens*, проводили методом газов жидкостной хроматографии - масс-спектрометрия (ГХ-МС) по сравнению с библиотекой Национального института стандартов и технологий (англ. NIST-08). Оценку антибактериальной активности СЖК и производных проводили по значениям диаметра зоны ингибирования (ДЗИ), минимальной подавляющей концентрации (МПК), минимальной бактерицидной концентрации (МБК), 50% от минимальной подавляющей концентрации (МПК50), кинетики времени уничтожения, методов лизиса бактерий. Устойчивость к ЖК в КВМЭЗ или антибиотикам, реализованная с помощью анализа устойчивости. Жизнеспособность клеток, повреждение клеточной стенки, проницаемость клеточной мембраны, утечка содержимого цитоплазмы, внутриклеточный АТФ, методы микроскопии и другие анализы оценивали выяснение механизма действия ЖК и производных в КВМЭЗ. Биологическую безопасность ЖК в КВМЭЗ для человека определяли с помощью анализа цитотоксичности 3-(4, 5-диметилтиазол-2-ил)-2, 5-дифенил-тетразолиум) [МТТ] против нормальных клеток ЭПЧ-293. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы graph pad prism 7 software и Microsoft Excel.

Заявления, представленные для защиты

1. Предложен новый экстракционный раствор для извлечения свободных жирных кислот (СЖК) и их производных из жира личинок *H. illucens*, состоящий из воды, метанола и соляной кислоты в соотношении 90:9:1 (об/об) и выхода экстракта 4,33% (ма/об) выход экстракции.
2. Была разработана новая последовательная процедура из трех раундов экстракции с целью получения наиболее устойчивого и антимикробно активного экстракта КВМЭЗ из жира личинок *H. illucens*.
3. Антимикробную активность КВМЭЗ, полученную методом последовательной экстракции, тестировали в отношении *K. pneumoniae* (АТСС ВАА-2473), *K. pneumoniae* КРМ9, *K. pneumoniae* КРi1627, *Aeromonas hydrophila* (АТСС 49140), *Aeromonas salmonicida* (АТСС 33658), *Pantoea agglomerans* (АТСС 27995), *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (АТСС 13951), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (АТСС 15713), *Pectobacterium atrosepticum* (АТСС ВАА-672D), *Dickeya solani* (NCBI IPO 2222), *S. aureus* (АТСС 55804) и *Acinetobacter baumannii* (АТСС ВАА-2900), патогенные бактерии.
4. Комбинация насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (НЖК, неНЖК) и их производных способна ингибировать и уничтожать наиболее важные фитопатогенные бактерии, включая *Pantoea agglomerans*, *Xanthomonas campestris*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* и *Dickeya solani* с МПК 0,78 мг/мл и МБК 0,78-1,56 мг/мл СЖК.

5. Экстракт КВМЭЗ, выделенный из жира личинок *H. illucens*, продемонстрировал высокую антибактериальную активность в отношении гипермуковязких штаммов *K. pneumoniae* с МПК и МБК 0,25 мг/мл. КВМЭЗ способен уничтожить клинические штаммы *K. pneumoniae* КРi1627 и экологические штаммы *K. pneumoniae* КРМ9, которые классифицируются как штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), приводящей к высоким показателям смертности при тяжелых внутрибольничных инфекциях.
6. Экстракт КВМЭЗ показал ингибирование и способность к элиминации при образовании биопленки штаммами *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 *K. pneumoniae* КРМ9, *K. pneumoniae* КРi1627. Факторы вирулентности подвижности и вязкости слизи при образовании биопленки были значительно снижены, когда штаммы *K. pneumoniae* обрабатывали субмикронном (0,125 мг/мл) КВМЭЗ. Кроме того, КВМЭЗ уничтожает зрелые биопленки, образованные штаммами *K. pneumoniae*, при 1,0 мг/мл по сравнению с используемым эталонным антибиотиком доксициклин (До), который не мог разрушить зрелые биопленки при 4,0 мг/мл.
7. Протестированные МЛУ-бактерии человека, включая *K. pneumoniae* КРi1627, *K. pneumoniae* КРМ9, *S. aureus* ATCC 55804, *A. baumannii* ATCC 19606 и ШЛУ, включая штамм *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, не вызывали резистентности к КВМЭЗ в течение 16 пассажей после обработки 0,125 МПК КВМЭЗ, в то время как высокая значительная резистентность (кратная изменения МПК >250) индуцировалось после лечения различными категориями антибиотиков.
8. СЖК КВМЭЗ проявляют бактерицидную (МПК₅₀ < 0,25 мг/мл) активность по отношению ко всем штаммам МЛУ-бактерий человека, таким как *K. pneumoniae* КРi1627, *K. pneumoniae* КРМ9, *S. aureus* ATCC 55804, *A. baumannii* ATCC 19606 и штамм *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, в то время как он безопасен для нормальных почек человека. Клетки ЭПЧ-293 (концентрация полумаксимального ингибирования (КП₅₀) = 0,266 мг/мл).
9. Кинетика времени уничтожения КВМЭЗ регистрировалась 5 и 10 мин для штаммов *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804, обработанных 4-кратным микром КВМЭЗ, в то время как оно было увеличено до 12 ч и 24 ч, когда эти штаммы подвергались воздействию 4-кратного микромикробного антибиотика (Пенициллин-Стрептомицин (П/С)).
10. Механизм антибактериального действия СЖК и производных в КВМЭЗ был описан несколькими путями, включая: (1) повышение проницаемости и жесткости клеточной мембраны из-за осмотической проницаемости и образования пор мембраны; (2) повреждение клеточной стенки из-за блокирования ферментативного процесса клеточной стенки; (3) разрушение клеточной мембраны за счет снижения текучести мембраны из-за эффекта неНЖК; (4) изменение размеров, морфологии и компартментализации бактериальных клеток, визуализируемых с помощью атомно-силовой микроскопии, сканирующей электронной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии; (5) нарушение цепи переноса электронов в

бактериальной клетке, обработанной КВМЭЗ, кроме того, форма гидрофобности ЖК, подобная липосоме, вокруг бактериальной клетки, которая блокирует все метаболические процессы и, в конечном итоге, приводит к гибели клетки.

Достоверность и апробация результатов исследования

Все эксперименты проводились в лаборатории разработки инновационных лекарственных средств и агробιοтехнологий Московского физико-технического института (Национальный исследовательский университет) (МФТИ), и научно-исследовательский институт вирусологии, Москва. Результаты были получены в среднем по результатам трех независимых экспериментов. Методы вариационной статистики подтвердили степень достоверности полученных экспериментов. Выводы были надежными при принятом уровне достоверности $p=0,95\%$. По результатам диссертационной работы опубликовано 6 статей, из них 3 статьи опубликованы в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, и 3 статьи опубликованы в сборниках материалов международных конференций. Кроме того, результаты исследований были представлены на 11 международных конференциях.

Работа выполнена при поддержке грантов: Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 02.А03.21.0003) и государственного задания ЧНЦБР РАН, проект АААА-А20-120101390066-3.

Структура диссертации.

Диссертационная работа выполнена в Лаборатории разработки инновационных лекарственных средств и агробιοтехнологий Московского физико-технического института (Национального исследовательского университета), в Физтехе-Школе биологической и медицинской физики (ФБМФ), кафедры инновационной фармацевтики, медицинского оборудования и биотехнологий. Диссертация содержит введение, 7 глав, заключение, список литературы из 391 источников и приложение. Он написан на 223 страницах типового письменного теста, включает 55 рисунков, 27 таблиц и приложение, включающее 8 дополнительных рисунков и 3 дополнительные таблицы.

Личный вклад автора

Экспериментальные данные, представленные в работе, были получены лично автором на всех этапах выполнения диссертационной работы. Автор провел, спроектировал и внедрил всю экспериментальную работу и статистический анализ, а также представил эти результаты для научного анализа. Вместе с научным руководителем и заведующим лабораторией он подготовил и опубликовал научные статьи, основанные на полученных данных.

Публикации автора по теме диссертации

1. [Проиндексировано в Web of science и Scopus, **QI, IF: 6.064**] **Mohamed, H.**; Marusich, E.;

- Afanasev, Y.; Leonov, S. Bacterial outer membrane permeability increase underlies the bactericidal effect of fatty acids from *Hermetia illucens* (Black soldier fly) larvae fat against hypermucoviscous isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.844811>.
2. [Проиндексировано в Web of science и Scopus, **Q1, IF: 6.208**] **Mohamed, H.**; Marusich, E.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Fatty acids-enriched fractions of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) larvae fat can combat MDR pathogenic fish bacteria *Aeromonas* spp.//*Int. J. Mol. Sci.* 2021, *22*, 8829. <https://doi.org/10.3390/ijms22168829>.
3. [Проиндексировано в Web of science и Scopus, **Q2, IF: 4.926**] Marusich E, **Mohamed H**, Afanasev Y, Leonov S. Fatty acids from *Hermetia illucens* larvae fat inhibit the proliferation and growth of actual phytopathogens// *Microorganisms*, 2020 Sep 16; 8(9):1423. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091423>
4. **Mohamed. H**, Marusich. E, Leonov. S. Cascade extraction of Black soldier fly larvae fat enriched the antibacterial activities against fish pathogens *A. hydrophila* и *A. salmonicida*, 64th Conference, MIPT, ISBN 978-5-7417-0758-6. P: 84-85, 2021. https://mipt.ru/priority2030/info/64%20%D0%BD%D0%B0%D1%83%D1%87%20%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D1%84%20%D0%A4%D0%91%D0%9C%D0%A4_1.pdf
5. Marusich E, **Mohamed H**, Ivanov G, Leonov S. Discovery of antimicrobial activity of natural products from Black soldier *Hermetia illucens* for agricultural protection. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, Vol. (84):2, P: 138-141, 2019. https://www.researchgate.net/publication/360450010_Discovery_of_antimicrobial_activity_of_natural_products_from_Black_soldier_fly_larvae_for_agricultural_protection
6. **Mohamed. H**, Marusich. E, Afanasev. Y, E, Bendik. I, Leonov. S. Active compounds extracted from *Hermetia illucens* larvae fat inhibit phytopathogenic bacteria, *Biological and medical physics*, MIPT, ISBN 978-5-7417-0758-6. P: 76-78, 2020. <https://mipt.ru/priority2030/%D0%A4%D0%91%D0%9C%D0%A4%20%D0%A4%D0%98%D0%9D%D0%90%D0%9B.pdf>.

Результаты проделанной работы были представлены на следующих международных научных конференциях:

1. **Mohamed, H.**; Marusich, E.; Leonov, S. Antimicrobial activity of extract from *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) larvae against multi drug-resistant (MDR) human pathogenic bacteria //, in proceedings of the 1st international electronic conference on antibiotics—The equal power of antibiotics and antimicrobial resistance (Basel, Switzerland, 8–17 May 2021).

2. **H. Mohamed**, E. Marusich and S. Leonov. Free fatty acids and its derivatives isolated from *Hermetia illucens* larvae fat shows antimicrobial efficacy against gram negative phytopathogenic bacteria. International webinar on mass spectrometry and separation techniques (Kington, UK, 06-03-2021).
3. **Mohamed. H.** Breaking the wall of multidrug resistant bacteria, Falling Walls Lab, Moscow, Skoltech Institute of Science and Technology (Moscow, Russia 01-10-2020).
4. К. Семейская, **Х. Мохамед**, Р-Л. Заранайна, Ю. Афанасьев, И. Бендик, Е. Марусич, С. Леонов, Универсальность метода экстракции жирных кислот из жира личинки мухи «Черная львинка», подтвержденная методом газо-жидкостной хроматографии (Москва, Россия, 29.11.2021-03.12.2022).
5. The Future Applications of bacteriophages conference in Egypt (Cairo, Egypt, 12, 13-03-2021).
6. Wasson-ECE "Technical Advances in Process GC-MS". (Colorado, USA, 08-03-2021).
7. Molecule design | and application of chemical probe (Basel, Switzerland, 11-03-2021).
8. Catalysts Webinar | CO₂ Valorization and Conversion into Value-Added Chemicals (Basel, Switzerland, 17-03-2021).
9. Quality assurance and data integrity from an auditor's viewpoint (Kent, United Kingdom, 14-07-2021).
10. Insects as feed and food (Hertfordshire, United Kingdom, 20-22, April 2021).
11. Keeping your GC-MS happy and healthy: installation, care, and maintenance (Washington, USA, 20-01-2022).

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Муха *Hermetia illucens*

1.1.1. Классификация и жизненный цикл *Hermetia illucens*

Муха Черная львица (*Hermetia illucens*) относится к царству *Animalia*, типу членистоногих, классу насекомых, отряду двукрылых и семейству *Stratiomyidae* [11]. Происхождение *H. illucens* - неотропическое царство, географически включающее юг Соединенных Штатов и регионы Южной Америки, в то время как оно распространилось по всей мир в последние десятилетия. Она была распространена в большинстве регионов Америки, Европы и Прибалтийской зоны России. Более того, она также может встречаться в тропических регионах Африки, Азии и Австралии [12,13]. Жизненный цикл *H. illucens* включает в себя четыре фазы: яйцо, личинка, куколка и взрослая муха, в то время как рост личинки состоит из шести стадий (рисунок 1).

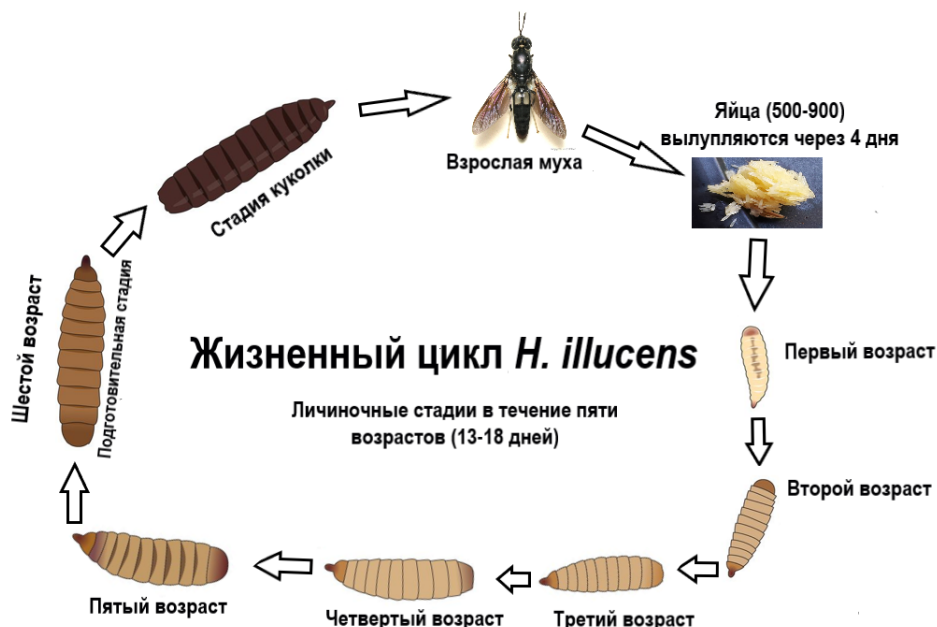


Рисунок 1. Стадии жизненного цикла черной солдатской мухи (*Hermetia illucens*), модифицированной по данным De Smet *et al.* [14].

Взрослая самка откладывает от 206 до 639 яиц одновременно. Эти яйца обычно помещаются на поверхности над или рядом с разложившимся субстратом таким как навоз или компост, и вылупляются в течение четырех дней. В нескольких литературных источниках определены размеры свежих личинок, которые начинаются с одного мм в первой фазе и достигают 25 мм на последней стадии и 6 мм в ширину. Они тусклого беловатого цвета с маленькой выступающей головкой, содержащей жевательные ротовые части; в дальнейшем их вес начинается с 0,22 г и достигает 3,4 г в конце личиночной стадии [15–17].

Личинки *H. illucens* способны питаться широким спектром органических веществ; более того, они могут адаптироваться к рациону с различных питательных веществ [12,18]. Личиночная стадия обычно развивается от 18 до 36 дней, в зависимости от пищевых субстратов, предлагаемым личинкам, в то время как препупальная стадия длится всего семь дней. Критические условия окружающей среды, в частности низкая температура и отсутствие пищи, приводят к сокращению продолжительности жизни личиночной стадии, в то время как стадия куколки длится от одной до двух недель [13,19,20]. Взрослые особи обычно могут прожить от 47 до 73 дней, если их выращивать в оптимальных условиях, дополнительно обеспечивая достаточным количеством воды и пищи. Кроме того, они может выжить от восьми до десяти дней в зависимости от жирового резервуара, образовавшегося на личиночной стадии, снабжаемой водой; кроме того, взрослая *H. illucens* может выжить в течение нескольких дней без корма или воды, полагаясь на жиры, накопленные на личиночной стадии развития [21].

1.1.2. Важность личинок *H. Illucens*

Личинки мухи Черная львинка (ЛМЧЛ) способны превращать различные органические отходы в высоко ценные соединения; кроме того, они может питаться различными органическими веществами, такими как коровий навоз, рыбные субпродукты, побочные продукты пивоварения и отходы ресторанов [22–24]. Химический состав личинок *H. illucens* может варьировать в зависимости от субстрата для выращивания, в то время как в целом ЛМЧЛ содержат около 40% белка и 30% жира в пересчете на сухое вещество. Благодаря своему составу ЛМЧЛ можно использовать в качестве сырья в кормах для различных животных, таких как домашняя птица и рыба [25–27]. ЛМЧЛ может быть более устойчивым альтернативным источником белка и жира в кормах, используемых в аквакультуре и птицеводстве, однако для использования ЛМЧЛ в качестве безопасного источника пищи, пригодного для потребления человеком, все еще существуют некоторые проблемы [28].

По сравнению с другими насекомыми, было обнаружено, что ЛМЧЛ содержат большое количество жира, особенно в форме насыщенных жирных кислот (НЖК). Кроме того, в нескольких исследованиях сообщалось, что может быть разработана модификация питательной композиции ЛМЧЛ и в зависимости от диетических композиций [23,29–31]. Более ранние исследования показывают, что значительный успех был достигнут в изменении состава жирных кислот ЛМЧЛ, где в организме ЛМЧЛ было обнаружено большое количество эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК; C20:5) и докозагексаеновой кислоты (ДГК; C22:6), когда они питались рыбной мукой и водорослями [32,33].

H. illucens является ценным природным источником биологически активных соединений, исключительно обогащенных липидами, по сравнению с другими насекомыми. Содержание липидов в личинках в основном богато лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, олеиновой, каприновой, линолевой и другими среднецепочечными жирными кислотами, где миристиновая кислота обладает широким спектром антибактериального действия, ларвицидной и репеллентной активностью [30,34,35]. Choi и Jiang [36], сообщили об активности гександиоевой кислоты, экстрагированной из ЛМЧЛ, как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Состав липидов варьируется в зависимости от способа обработки личинок, что может привести к различным профилям жирных кислот [31,37]. Липиды и их производные обладают антимикробными свойствами и, как было показано, проявляют антибактериальную активность в ходе исследований *in vitro* и *in vivo*, что потенциально может привести к поиску новых природных альтернатив, полезных в рыбохозяйственных подразделениях [38]. Потенциал *H. illucens* заключается в разведении насекомых для получения биодизельного топлива и муки из насекомых с высокими питательными свойствами для рыбоводства и корма для домашних животных. ЛМЧЛ способен жить в неблагоприятных условиях, что указывает на то, что *H. illucens* обладает врожденной иммунной системой, которая может вырабатывать различные вещества, такие как пептиды, которые могут защитить их от бактерий, грибков и вирусов. Недавно было запатентовано средство по уходу за кожей в сочетании со стерилизованным маслом *H. illucens* в их рецептуре. Использование альтернативных растворителей для извлечения масла с улучшенными функциональными свойствами из биомассы насекомых может привести к большему количеству инноваций и его включению в косметические и терапевтические составы [39–41].

1.1.3. Влияние субстрата для выращивания на состав жирных кислот ЛМЧЛ

H. illucens демонстрирует высокое содержание липидов (до 500 г/кг), но состав его жирных кислот не всегда съедобен для потребления животными и людьми, а также для использования в медицинских целях [25,42–44]. Это связано с низким содержанием мононенасыщенных (МНЖК) и полиненасыщенных (ПНЖК) жирных кислот и высоким содержанием насыщенных (НЖК) в составе липидов личинок [25,27,37,45,46].

Содержание липидов после обезвоживания личинок *H. illucens* снижается до 35%. Содержание жира сильно зависит от стадии развития насекомого, и, как правило, его количество уменьшается в течение его жизненного цикла от куколки до взрослой особи [47,48]. Несколько исследований показали, что насыщенные жирные кислоты являются основной группой жирных кислот в личинках *H. illucens*, где лауриновая кислота (C12:0) является наиболее распространенной, за ней следуют пальмитиновая (C16:0) и олеиновая кислоты (C18:1 n-9)

[23,29,38,49,50]. Barroso *et al.* [29] и Liland *et al.* [32] обнаружили высокий процент (12-24%) линолевой кислоты (C18:2) у личинок, когда рацион питания включал рыбную муку и куриный корм, или пшеницу и бурые водоросли, в то время как Ewald *et al.* [51] оценили низкие уровни линолевой кислоты (C18:2), которая варьировала от 3% до 13%. Существует большое сходство по составу между жирными кислотами личинок и субстрата, где пальмитиновая, олеиновая и линолевая кислоты являются наиболее распространенными жирными кислотами, содержащимися в субстратах, в диапазоне 8-32%, 6-42% и 4-36%, соответственно. Кроме того, эти жирные кислоты являются одними из наиболее распространенных жирных кислот, присутствующих в тканях растений и животных [49,52].

Некоторые жирные кислоты, такие как лауриновая кислота (C12:0), могут синтезироваться личинками, не соответствующие тем, которые содержатся в рационе ЛМЧЛ, кроме того, они содержатся в высоких значениях (13-52%) в телах личинок, по сравнению с низкими значениями (0-1%), обнаруживаемыми в субстратах [23,49]. Эти авторы также предполагают, что личинки могут синтезировать лауриновую кислоту из углеводов в субстрате, поэтому выращивание ЛМЧЛ на хлебе (79% углеводов) дает высокий уровень лауриновой кислоты (28%). Кроме того, обнаружена значительная положительная корреляция между массой личинок и процентным содержанием лауриновой кислоты (C12:0) и общим содержанием НЖК в личинках, это может свидетельствовать о том, что эти жирные кислоты накапливаются и увеличиваются, когда личинки набирают вес и делятся до заключительных стадий [53].

Высокое содержание НЖК может отличать ЛМЧЛ от личинок других насекомых. Поскольку взрослые *H. illucens* не питаются, жирные кислоты в личинках могут накапливать энергию для этой более поздней стадии жизни, эта энергия может накапливаться в форме НЖК, поскольку они менее подвержены окислению, чем ненасыщенные жирные кислоты [34,45]. Было обнаружено, что большинство видов насекомых синтезируют миристиновую (C14:0), пальмитиновую (C16:0) и стеариновую кислоты (C18:0) *de novo* и обладают ферментами, необходимыми для производства миристолеиновой (C14:1), пальмитолеиновой (C16:1) и олеиновой кислот (C18:1 n-9) [54,55]. Однако ЛМЧЛ не способны синтезировать вакциновую кислоту, которая была обнаружена в низких концентрациях (0.8–1.5%) [51].

ЛМЧЛ не способны синтезировать ПНЖК, в то время как линолевая кислота (C18:2) и α -линоленовая кислота (АЛК; C18:3), эйкозапентаеновая кислота (ЭПК; C20:5) и докозагексаеновая кислота (ДГК; C22:6), которые были обнаружены у личинок, скорее всего, происходят из субстрата [32]. Tvrzicka *et al.* [56] заявили, что ферменты, необходимые для производства линолевой кислоты и АЛК (предшественника ЭПК и ДГК), были обнаружены в основном в исследованиях растений и морских водорослей. Некоторые насекомые, например, сверчки и тараканы способны продуцировать линолеую кислоту *de novo*, в то время как ЛМЧЛ

не способны продуцировать подобные жирные кислоты [57,58]. С одной стороны, процентное содержание ЭПК и ДГК в личинках зависит главным образом от их количества в рационе, в то время как обнаружено, что эти жирные кислоты уменьшаются по мере роста личинок [32], с другой стороны, Liu *et al.* [53] показали снижение ненасыщенных жирных кислот с течением времени по мере взросления ЛМЧЛ. Снижение ЭПК и ДГК, скорее всего, связано с тем, что содержание лауриновой кислоты и НЖК увеличиваются более высокими темпами по мере роста ЛМЧЛ. Это говорит о том, что производство ЛМЧЛ с высоким содержанием ЭПК и ДГК приведет к менее эффективному их использованию и увеличению отходов этих жирных кислот. По-видимому, существует разница в удержании ЭПК и ДГК, также возможно, что в ЛМЧЛ существуют механизмы, способствующие включению ЭПК вместо ДГК, как это было предложено Barroso *et al.* [29]. Количество омега-3 жирных кислот ПНЖК увеличивается в телах личинок, когда ЛМЧЛ выращивают на субстрате с высоким содержанием этих жирных кислот [36,50].

Содержание сырого жира, по-видимому, в основном связано с процентным содержанием идентифицированных жирных кислот в личинках. Это говорит о том, что фракция, называемая сырым жиром в личинках, в основном состоит из жирных кислот. Помимо стадии личиночного развития, также оказалось, что содержание углеводов в рационе влияет на содержание сырого жира в личинках. Spranghers *et al.* [18] обнаружили сильную корреляцию между сырым жиром преупов и содержанием неволокнистых углеводов в субстрате. Этим можно объяснить, почему личинки, которых кормили хлебом, содержали так много жира. Более того, Li *et al.* [52] обнаружили увеличение количества липидов в ЛМЧЛ при добавлении в рацион высоких уровней глюкозы и ксилозы. Было обнаружено, что на жирнокислотный состав ЛМЧЛ влияют два различных фактора: жирнокислотный состав субстрата и масса личинки. Оба этих фактора связаны с субстратом, поскольку на рост личинок влияют свойства субстрата [23]. Это может проложить путь к разработке профиля жирных кислот ЛМЧЛ путем выбора субстрата и времени сбора личинок ЛМЧЛ.

Качество липидов из личинок *H. illucens* высокое и соответствует качеству продуктов из других животных и растительных источников, например, пальмового (косточного) масла. В отличие от аминокислотного состава, липидный состав может быть изменен различными диетами личинок. Специфический рацион личинок приводит к липидному составу (основанному на длине углеродной цепи), который напоминает состав пальмового масла и пальмоядрового масла. При добавлении 30% жира для жарки в рацион личинок увеличиваются фракции пальмитиновой и олеиновой кислот, в то время как содержание линолевой кислоты значительно снижается. В зависимости от предполагаемого назначения (корм для животных или промышленное использование) можно разработать желаемую композицию жирных кислот для

личинок. Примечательно высокое содержание лауриновой кислоты (до 50%), сырья для многих продуктов в чистящей и моющей промышленности [59].

Устойчивое использование природных ресурсов может быть улучшено, если использовать комплексные подходы для решения проблем перепроизводства, утилизации твердых органических отходов и растущего спроса на натуральное сырье. Природные биологически активные соединения были обнаружены в природе из различных источников, таких как растения, животные и различные виды микроорганизмов [60]. Массовые культуры насекомых стали доступны в последние годы в качестве источника белков и липидов и в настоящее время рассматриваются в качестве многообещающей альтернативы. Этому есть разумное обоснование, поскольку насекомые являются высокоэффективными биопреобразователями отходов, оказывают низкое воздействие на окружающую среду, поскольку они выделяют меньше вредных для климата парниковых газов и потребляют меньше воды, а риск зооноза снижается. Кроме того, их можно кормить органическими отходами из различных источников и выращивать на небольших поверхностях, что делает возможным крупномасштабное промышленное разведение [61,62]. В этом контексте выращивание *H. illucens* вызвали большой интерес и применение в нескольких секторах, которые уже предусмотрены, особенно из-за их питательной ценности.

1.1.4. Влияние процедур экстракции на жирно кислотный состав личинок *H. illucens*

Процессы экстракции и фракционирования липидов требуют подходящих органических растворителей и методов, которые не используются при очистке водорастворимых молекул, таких как белки и углеводы. Сложные липидные смеси в неполярных растворителях могут быть разделены в зависимости от полярности и растворимости [63,64]. Липиды, которые содержат жирные кислоты, связанные сложноэфирными или амидными связями, могут быть гидролизрованы с помощью некоторых катализаторов, таких как кислоты, щелочи и гидролитические ферменты. Органические растворители, такие как эфир, хлороформ и бензол, способны извлекать нейтральные липиды, такие как триацилглицерины, пигменты и воски, в то время как полярные органические растворители, такие как метанол и этанол, могут легко извлекать мембранные липиды. Эти полярные соединения могут уменьшать гидрофобные взаимодействия и ослаблять водородные связи и электростатические взаимодействия, которые связывают липиды с мембранными белками [65]. Существует несколько стадий извлечения липидов, таких как восстановление образца, гидролиз, гомогенизация органическим растворителем, разделение органической и водной фазы, удаление загрязняющих веществ и, наконец, сушка экстракта для удаления органического растворителя. Для экстракции различных

типов липидов необходимо множество стандартных процедур, поскольку каждая матрица обладает различными характеристиками [66,67].

Первым аспектом в выборе способа экстракции липидов является размер образца, где малый размер частиц увеличивает поверхность экстрагируемой матрицы и дает больше шансов на контакт с органическим растворителем, а также повышает выход экстрагируемого вещества. Диэтиловый эфир или гексан неэффективны в процессе экстракции липидов, кроме того, использование только воды в качестве растворителя не является предпочтительным, поскольку это требует более высоких затрат, поскольку разделение растворенных веществ требует много энергии, когда используется только вода. Обычной обработкой является кислотный или основной гидролиз, где он помогает легко отделять липиды от белков или углеводов и расщеплять эмульгированные жиры [61].

Выбор типа растворителя и процедуры экстракции зависят от химической структуры образца и типа липида, который требуется экстрагировать. Растворитель должен обладать высокой растворимостью липидных соединений. Растворитель должен легко проникать в образец и иметь низкую температуру кипения, чтобы его можно было легко испарять. Наиболее распространенными растворителями, используемыми для экстракции или растворимости липидов, являются спирты (метанол, этанол и *n*-бутанол), ацетонитрил, ацетон, галогенированные углеводороды (хлороформ, дихлорметан), простые эфиры, углеводороды (бензол, гексан) или их смесь. Существует много разработанных традиционных методов экстракции липидов, которые включают метод Фолча, термическое профилирование протеома, метод Блая и Дайера, метод Матьяша, метод сверхкритической жидкостной экстракции и метод Сокслета [62]. Промышленное извлечение жиров из свежих или сушеных личинок осуществляется по различным методикам [68,69].

Высушенную биомассу ЛМЧЛ подвергают механическому прессованию для получения обезжиренной и частично обезжиренной муки, что может происходить при температуре 100 °С, и этот процесс обычно используется для извлечения масла из орехов и семян. Во время процесса из личинок выжимается жир и получается форма для прессования лепешек. Существует два важных различных способа фракционирования ЛМЧЛ, которые включают сухую обработку и влажную с использованием шнекового пресса, где первый включает процесс сушки ЛМЧЛ перед прессованием, в то время как во втором способе свежие ЛМЧЛ прессуются непосредственно [70,71].

Во время последовательных процессов экстракции жира личинок *H. illucens* происходит множество химических реакций между соединениями растворителя и матрицы. Физические и химические свойства липидов зависят от многих факторов, таких как состав их жирных кислот,

длина и степень насыщения углеродной цепи, а также их температуры плавления. Термический гидролиз происходит в основном в масляной фазе, а не на границе раздела вода-масло [67].

Свободные жирные кислоты выделяются из жира ЛМЧЛ, включая три стадии, такие как гидролиз, обработка ультразвуком и гомогенизация в условиях медленного катализа соляной кислотой. Кроме того, кислотный катализ в воде способствовал реакции гидролиза при последовательной экстракции [72].

1.1.5. Формирование дисперсионных систем путем экстракции жира личинок *H. Illucens*

Масла и жиры содержат триглицериды, которые обычно состоят из глицерина и насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Физические свойства коммерческих жиров в основном зависят от состава жирных кислот и триацилглицерина [73,74]. Тип жирной кислоты в каждом положении оказывает глубокое влияние на физическое поведение жира и масла, где относительные пропорции каждого триацилглицерина в жире и масле имеют решающее значение для их общего поведения и стабильности [70]. Жиры расплавляют при температуре (22-40 °С) в присутствии кислого водно-метанольного раствора, где кислота HCl гидролизует дисперсные жиры с получением эмульсии НЖК и не НЖК. Образовавшаяся эмульсия представляет собой коллоидно-дисперсионную систему, состоящую из двух несмешивающихся жидких фаз, где дисперсная фаза (масляный слой) присутствует в верхней фазе, в то время как водная фаза (водный слой) содержит выделившиеся СЖК и глицерин. Обычные механизмы, приводящие к физической нестабильности эмульсий, включают взбивание, осаждение, флокуляцию, коалесценцию или созревание по Оствальду [71]. Гидролиз более желателен в масле с короткими жирными кислотами, такими как цис-олеиновая кислота, чем в масле с длинными жирными кислотами, такими как стеариновая, миристиновая и лауриновая кислоты, поскольку короткие жирные кислоты более растворимы в воде, чем длинные насыщенные жирные кислоты. Этерификация, осуществляемая с помощью метанола с использованием HCl, действует как катализатор, который ускоряет реакцию между растворителем и маслом с получением глицерина в качестве побочного продукта наряду с СЖК. Поведение различных липидов в таких системах определяли, как соотношение разделения (мицеллярная/эмульгированная масляная фаза). Было обнаружено, что распределение жирных кислот сильно зависит от длины цепи жирной кислоты и pH дисперсии. Гидролиз масла усиливается при длительном взаимодействии двух несмешивающихся дисперсионных систем и большом количестве воды [67]. Последовательная экстракция одной и той же биомассы масла увеличивала и обогащала количество СЖК (олеиновой кислоты) и глицерина, которые, в соответствии с процессом переэтерификации, увеличивали количество пальмитиновой кислоты и предотвращали образование транс - изомеров [70]. Дисперсионные системы, содержащие жирные кислоты и различные типы глицеридов с

улучшенными физико-химическими свойствами и желаемой функциональностью, могут применяться и использоваться в качестве антибактериальных средств, косметических и фармацевтических эмульсий.

1.1.6. Классификация липидов и жирных кислот

Липиды являются важными органическими молекулами, ответственными за различные функции клеточной мембраны, такие как передача сигналов, компартментализация, транспортировка и регуляция жизненно важной функции большинства белков, закрепленных на мембране или расположенных вне мембраны клетки [75]. Антимикробные липиды классифицируются в зависимости от длины их цепей и степени ненасыщенности. Липиды можно разделить на восемь категорий, включая: жирные кислоты, глицеролипиды, например, триацилглицерины (ТГ), глицерофосфолипиды (ГФЛ), сфинголипиды, стериновые липиды, пренольные липиды, сахаролипиды и поликетиды. ГФЛ известны как фосфолипиды, метки и стерины - наиболее распространенный тип, встречающийся в растениях и животных [73]. Классификация липидов показана на рисунке 2.

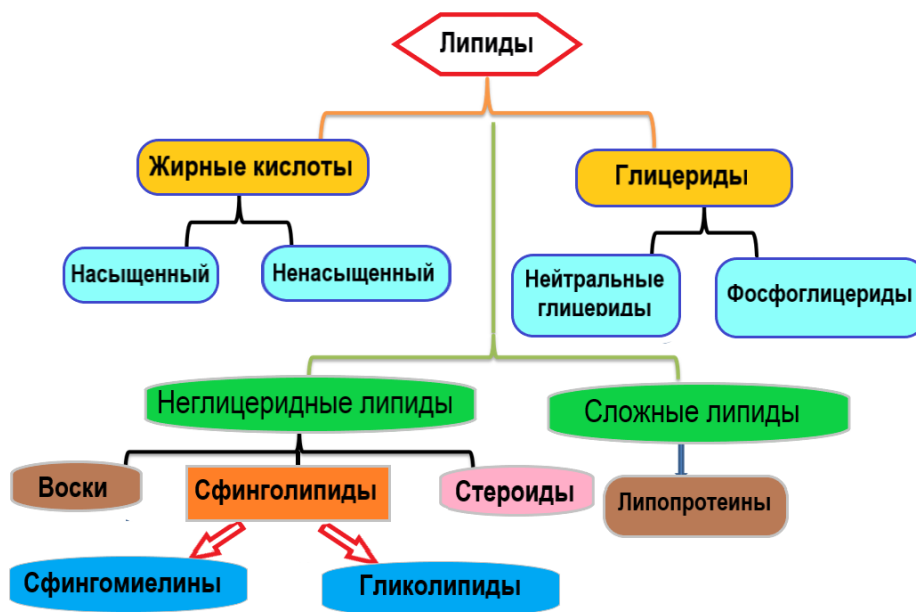


Рисунок 2. Классификация липидов.

Жирные кислоты являются наиболее распространенными незаменимыми биомолекулами в различных биологических системах и выполняют множество важных биологических функций, включая регуляцию функций клеточных мембран и активности ферментов внутри клетки. Жирные кислоты — это карбоновые кислоты, содержащие насыщенные или ненасыщенные алифатические углеводородные цепи. Их можно разделить на четыре группы следующим образом: (1) короткоцепочечные жирные кислоты (<math><C6</math>), (2) средне цепочечные жирные кислоты

(C6–C12), (3) длинноцепочечные жирные кислоты (C13–C21) и (4) очень длинноцепочечные жирные кислоты ($\geq C22$), в зависимости от длины цепи. Основные жирные кислоты в ЛМЧЛ представлены на рисунке 3.

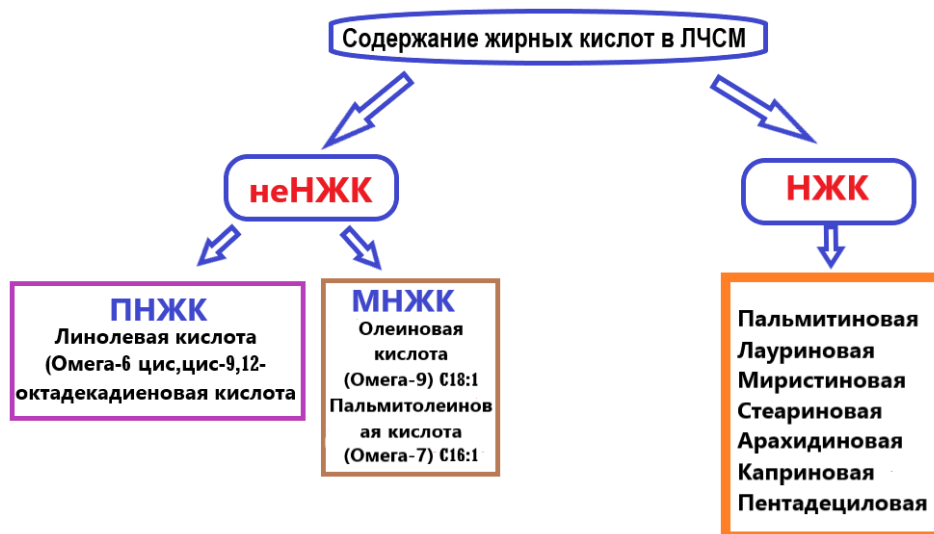


Рисунок 3. Наиболее распространенные биомолекулы жирных кислот в *H. illucens* жирные.

1.2. Антибиотики

1.2.1. Антибиотики как антибактериальные средства

Антибиотики определяются как тип противомикробных веществ, активных против микроорганизмов. Основными функциями антибактериального средства являются борьба с бактериальными инфекциями, и лечение антибиотиками широко используется для устранения таких инфекций. Они могут либо подавлять (бактериостатические), либо убивать (литические) рост бактерий. Несколько антибиотиков обладают антипротозойной активностью [76,77]. Открытие антибиотиков коренным образом изменило современную медицину и продлило продолжительность жизни человека. Антибиотики являются наиболее важным классом фармацевтических препаратов, и одним из самых эффективных медицинских изобретений двадцатого века. Они, несомненно, являются благодатью для человеческого общества в борьбе с бактериями, спасая миллионы жизней [78], где бактерии являются самым выдающимся примером с точки зрения заболеваемости и смертности. Важность антибиотиков позволила разработать многочисленные области медицинской практики, такие как хирургические операции и иммуносупрессивная терапия, основанные на антибиотикопрофилактике, а также потенциал для лечения инфекционных осложнений, устойчивости к противомикробным препаратам (УПП), что представляет собой серьезную проблему для всех систем здравоохранения во всем мире [79]. Тревожная картина заключается в том, что к 2050 году смертность увеличится до 50 миллионов

в год из-за увеличения числа устойчивых к антибиотикам бактерий, и это обойдется в 100 триллионов долларов США во всем мире [80].

1.2.2. Устойчивость к антибиотикам

Устойчивость к антибиотикам на сегодняшний день является ведущей проблемой глобального здравоохранения. Злоупотребление антибиотиками в медицинских, ветеринарных и сельскохозяйственных аспектах, включая неадекватное назначение антибиотиков, их чрезмерное использование в животноводстве и недостаточную гигиену в больницах, — все это способствует росту устойчивости к противомикробным препаратам (УПП). УПП указывает на способность бактерий и других микроорганизмов противостоять воздействию антибиотика, к которому они ранее были чувствительны, позволяя микробам выживать [81]. Устойчивые бактерии демонстрируют несколько механизмов борьбы с антибиотиками, и понимание механизмов, с помощью которых бактерии противостоят антибиотикам, будет важно для разрешения кризиса. Бактериями были разработаны различные эффективные стратегии для блокирования действия антибиотиков, что обычно не приводит к возникновению проблем при лечении инфекционных заболеваний, вызванных устойчивыми штаммами бактерий. Достоверно подтверждено, что различные бактерии зависят от различных физиологических и биохимических механизмов, вызывающих резистентность [76]. Очевидно, что число инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), растет во всем мире, и угроза неизлечимых инфекций была выявлена с начала 21 века [77]. УПП является основным источником беспокойства на протяжении многих лет, поскольку для установления устойчивости к антибиотику требуется короткое время, и около 70% патогенных бактерий становятся устойчивыми по крайней мере к одному антибиотику [82].

1.2.3. Причины устойчивости к антибиотикам

Микроорганизмы, такие как бактерии, являются живыми организмами, главной целью жизни которых является рост, размножение, выживание и распространение как можно быстрее. В результате микробы приспосабливаются к окружающей среде и распространяются таким образом, чтобы обеспечить себе постоянное существование [83]. Если что-то блокирует их рост, например, антимикробный агент, могут произойти генетические модификации, приводящие к резистентности бактерий, что позволяет им выжить [84]. Это естественный процесс развития устойчивости бактерий к лекарственным препаратам; однако несколько параметров остаются ответственными за устойчивость к антибиотикам. Они включают в себя генетические мутации, передачу генетического материала, избирательное давление, неточный диагноз, неправильное

назначение антибиотиков, самолечение, неадекватное и чрезмерное использование антибиотиков, плохие условия в больницах, широкое использование в сельском хозяйстве и доступность небольшого количества новых антибиотиков [85]. Рисунок 4 иллюстрирует ожидаемый механизм устойчивости к антибиотикам, индуцируемой бактериями [85].

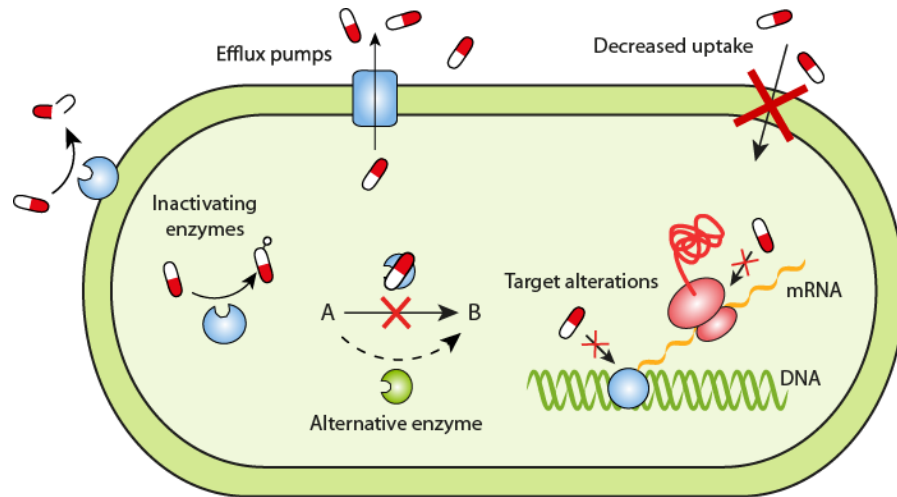


Рисунок 4. Механизмы устойчивости к антибиотикам, разработанные Uddin *et al* [85].

1.2.4. Механизмы устойчивости к антибиотикам

Естественная и приобретенная резистентность к антибиотикам представляют собой два типа устойчивости к антибиотикам. Считается, что нормальная резистентность является врожденной, которая часто экспрессируется в организмах, или опосредованной, тогда как гены обычно присутствуют в бактериальном геноме, но они стимулируются до уровня резистентности только после лечения целевым антибиотиком [86]. С другой стороны, приобретенная резистентность может возникать, когда бактерии приобретают генетический материал путем трансляции, конъюгации или транспозиции, или мутаций в собственной хромосомной ДНК [87,88]. Механизмы УПП можно разделить на четыре категории, включая ограничение поглощения лекарственного средства; модуляцию лекарственной мишени; ингибирование лекарственного средства; и отток лекарственного средства [89]. Основываясь на структурных различиях и других, грамотрицательные бактерии могут использовать все четыре механизма, в то время как клеточные стенки грамположительных бактерий не имеют липополисахаридов во внешней мембране, поэтому они редко используют механизмы ограниченного поглощения или оттока лекарств [84]. Образование биопленки является еще одним механизмом, который помогает в колонизации бактерий, кроме того, матрица биопленки включает полисахариды,

белки и ДНК, затрудняя проникновение антимикробных агентов в бактерии и тем самым обеспечивая обширную защиту [90,91].

Эти различные категории механизмов резистентности могут быть объяснены более подробно следующим образом. Грамотрицательные бактерии по своей природе менее проницаемы для некоторых антибиотиков, чем грамположительные бактерии, поскольку их внешняя мембрана создает защитный барьер для проницаемости благодаря наличию липополисахаридного слоя. Тот факт, что гликопептидные антибиотики, например ванкомицин, неэффективны против грамотрицательных бактерий из-за отсутствия проникновения через внешнюю мембрану, является яркой иллюстрацией эффективности этого естественного барьера [87].

Многие антибиотики активно выводятся из клетки с помощью откачивающих насосов бактерий, которые являются основными участниками, способствующими формированию внутренней резистентности грамотрицательных бактерий. Эти насосы приводят к появлению различных форм большинства бактерий. Эффлюксные насосы можно разделить на пять основных семейств в зависимости от их структуры и источников энергии, включая АТФ-связывающую кассету, малую множественную лекарственную устойчивость, экструзию множественных лекарственных и токсичных соединений и семейство резистентности-клубенькового деления клеток [86]. Устойчивость к тетрациклинам является примером устойчивости, опосредованной оттоком, при которой насосы оттока *Tet* используют протонный обмен в качестве источника энергии для выброса тетрациклинов за пределы бактериальной клетки [88].

Бактерии инактивируют антибиотики одним из двух способов - путем деградации лекарственного средства, или его химической модификации [87]. Кроме того, бактерии могут продуцировать ферменты, которые могут связываться с различными химическими группами воздействующих на него лекарств, таким образом, антибиотик не может соединиться или достичь своей цели в бактериальной клетке. Перенос некоторых групп, таких как ацетил, фосфорил и аденил, в соединение является наиболее важным методом инактивации лекарственного средства путем переноса химической группы. Ацетилирование является наиболее вероятным механизмом, используемым в различных антибиотиках, таких как аминогликозиды, хлорамфеникол, стрептограмины и фторхинолоны [89,92].

Бэта-лактамы препараты, такие как цефалоспорины и пенициллин, являются наиболее часто используемыми противомикробными средствами. Центральная структура этого класса лекарств имеет четырехстороннюю бэта-лактамную петлю, которая распределена между всеми членами. Активность фермента бэта-лактамазы разрушает бэта-лактамную петлю, которая является ключевым механизмом устойчивости к бэта-лактамам; поэтому бэта-лактамазы

гидролизуют образование бэта-лактамного кольца, нарушая его связывание с пенициллинсвязывающими белками (ПСБ) [90].

Модификация мишени антибиотиков является распространенным механизмом, с помощью которого бактерии индуцируют устойчивость к антибиотикам. Изменения в расположении ПСБ являются одним из специфических механизмов развития резистентности к β -лактамным препаратам. На количество лекарственного средства, которое может связываться с мишенью, влияют изменения количества или количества ПСБ [93,94]. Структурная модификация, например, развитие гена *tesA* у бактерий *S. aureus*, уменьшит или полностью заблокирует связывание препарата с его мишенью [91].

1.3. Жирные кислоты как природные биологически активные вещества

1.3.1. Спектр антибактериальной активности жирных кислот

Антимикробные липиды, особенно жирные кислоты и моноглицериды, являются перспективными антибактериальными соединениями, которые разрушают мембраны бактериальных клеток, вызывая широкий спектр ингибирующих эффектов [95]. Антимикробные липиды, которые разрушают или повреждают клеточную стенку или мембрану бактерий, являются привлекательными кандидатами на роль антибактериальных средств нового поколения для лечения ряда бактериальных заболеваний и альтернатив антибиотикам по многим аспектам. Особое внимание привлекают два класса антимикробных липидов, включая жирные кислоты [96] и моноглицериды, которые образуются в результате этерификации молекулы жирной кислоты и глицерина. Этим двум классам антимикробных липидов было уделено больше внимания благодаря новаторским исследованиям, которые были сосредоточены на антибактериальной эффективности жирных кислот и различных длинах цепей моноглицеридов [92,94,97,98]. Лауриновая кислота (ЛК) с длиной цепью в 12 углеродов обладает наиболее мощной активностью по уничтожению грамположительных бактерий; следовательно, его производное монолаурат глицерина (МЛГ) проявляло еще более сильное ингибирующее действие, чем ЛК. Управление по контролю за продуктами и лекарствами (англ. FDA) сообщило, что как ЛК, так и ГМЛ безопасны для использования и присутствуют в большом количестве в различных организмах. Эти усилия, предпринятые исследователями, привели к широкому и быстрому изучению ЛК и ГМЛ для применения в качестве противомикробных препаратов во многих областях, таких как сельское хозяйство и косметология [99–101]. Кроме того, каприновая кислота, которая обладает цепью длиной 10 углеродов, и ее производное, монокаприн, также привлекли внимание и, как показано, инактивируют распространенные возбудители мастита, включая *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uber*, *Staphylococcus*

aureus и *Escherichia coli* [102]. Более ранние исследования были проведены для эмпирической проверки антибактериальных свойств антимикробных липидов, объясняя, как физико-химические свойства антимикробных липидов влияют или взаимодействуют с биологической активностью, и это остается многообещающей целью во многих отношениях [98,103].

На сегодняшний день МПК считает наиболее важным среди первичных средств, используемых для оценки эффективности антимикробных липидов, дальнейшей оценки того, как лечение влияет на рост бактериальных клеток. МПК тестируемого соединения определяется как концентрация лекарственного средства, при которой не происходит видимого роста бактерий. Хотя такая информация специфична для области применения и эффективности противомикробного липида, но она не объясняет механизм действия, поэтому растет интерес к пониманию того, как эти противомикробные липиды повреждают и нарушают мембраны бактериальных клеток. Во многих литературных источниках подчеркивается, что антимикробные липиды действуют как бактериостатические (ингибиторы роста) или бактерицидные (убивающие) агенты в зависимости от концентрации препарата, типа штамма бактерий и различных факторов окружающей среды [96,104]. Методы электронной микроскопии являются многообещающими инструментами для непосредственного наблюдения морфологических изменений, происходящих в мембранах бактериальных клеток, которые, кроме того, используются для получения изображений образцов бактерий после воздействия антимикробных липидов [92,105]. Для визуализации повреждения мембран используются высокие концентрации антимикробного липида в диапазоне 5-10 мМ, поэтому бактериальные клетки можно исследовать только после обработки и фиксации образца. В целом, это сложная задача - прояснить кинетику взаимодействия на молекулярном уровне при работе со сложными соединениями в биологических образцах, таких как бактериальная клетка, что мотивирует к поиску разработки новых модельных систем.

Антимикробные липиды известны как одноцепочечные амфифильные липиды, которые способны взаимодействовать с мембранами бактериальных клеток и вызывать ингибирование бактерий. Жирные кислоты представляют собой широко изученный тип антимикробных липидов, и почти всегда обнаруживается, что они представляют собой насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь с группой карбоновой кислоты на одном конце. Таким образом, углеводородная цепь в жирных кислотах образует гидрофобную часть, в то время как группа карбоновой кислоты является гидрофильной, поэтому жирные кислоты являются амфипатическими молекулами [95]. Кроме того, было показано, что производные жирных кислот обладают антибактериальной активностью, причем одним из выдающихся классов являются моноглицериды, которые образованы из жирной кислоты, связанной с молекулой глицерина посредством сложноэфирной связи. Существуют синтетические варианты производных жирных

кислот, такие как родственные соединения с эфирными связями, которые могут сделать такие молекулы непроницаемыми для бактериальных липаз. Моноглицериды, при сравнении этих синтетических соединений с жирными кислотами, отличаются неионизируемыми функциональными группами при соответствующих значениях pH, поэтому они являются неионными молекулами со свойствами нейтрального электрического заряда [102]. Представители ЖК с различными молекулярными структурами представлены на рисунке 5.

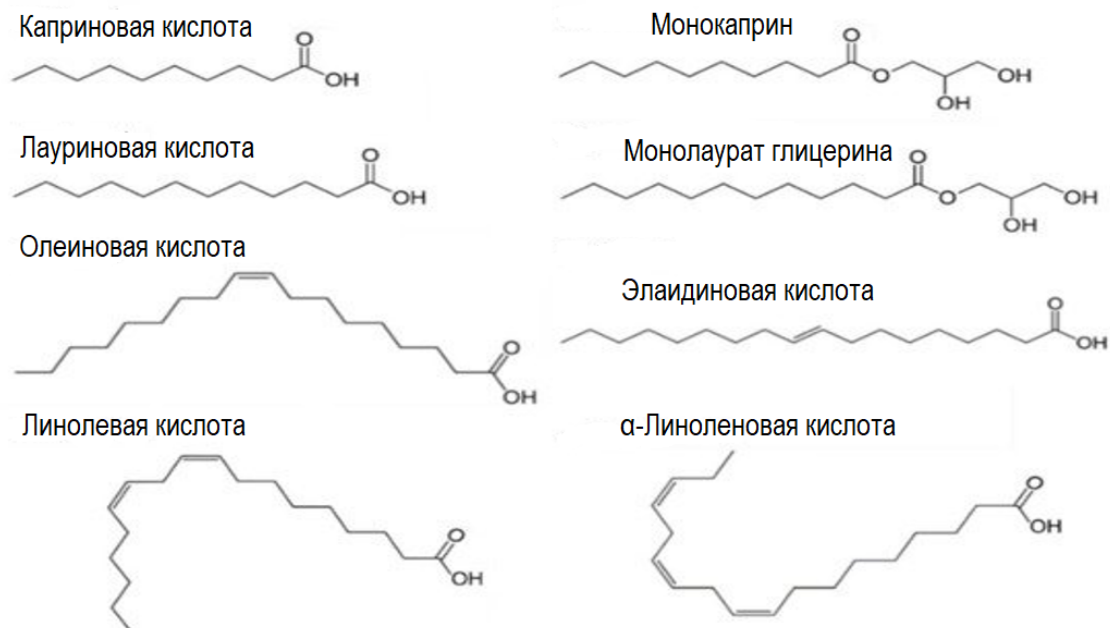


Рисунок 5. Химические структуры жирных кислот и моноглицеридов. Насыщенные жирные кислоты каприновая кислота (C10:0), ЛК (C12:0). моноглицериды; монокаприн (ГМЛ C10:0), монолаурат глицерина (ГМЛ C12:0). Ненасыщенные жирные кислоты; олеиновая кислота (C18:1), элаидиновая кислота (транс-C18:1). Полиненасыщенные жирные кислоты; линолевая кислота (C18:2), линоленовая кислота (C18:3) [95].

В целом, жирные кислоты, как правило, имеют определенное четное число атомов углерода в диапазоне от 4 до 28, в то время как другие варианты с нечетными номерами могут быть получены синтетическим путем. Короткоцепочечные жирные кислоты, длина которых составляет менее 8 атомов углерода, в то время как группа с более чем 12 атомами углерода известна как длинноцепочечные жирные кислоты, а среднецепочечные жирные кислоты, как известно, имеют атомы углерода от 8 до 12 [96,106]. Другим важным фактором является количество степеней ненасыщенности, при которых атомы углерода насыщенных жирных кислот связаны одинарными ковалентными связями, в то время как ненасыщенные жирные кислоты содержат одну или несколько двойных связей в углеродной цепи. Очевидно, когда жирные кислоты, имеющие более одной двойной связи, они определяются как полиненасыщенные жирные кислоты. Количество и ориентация (цис- или транс-) двойных связей могут изменяться и оказывать существенное влияние на различные физико-химические свойства

жирных кислот, даже среди соединений, которые имеют одинаковую длину углеводородной цепи. Таким образом, классификация жирных кислот и их производных является важной частью исследования тенденций их антимикробной активности в отношении молекулярной структуры и формы. На сегодняшний день были проведены обширные исследования ненасыщенных жирных кислот со средними или длинными цепями, которые обычно показывали более высокую эффективность против грамположительных бактерий, чем против грамотрицательных бактерий. Многие исследования также были сосредоточены на оценке антибактериальных свойств в присутствии соединений с двойными связями [107,108].

Chen *et al.* [109] определили эффективность миристиновой кислоты в отношении *Listeria monocytogenes*, которая вызывает ряд заболеваний пищевого происхождения. Примечательно, что жирные кислоты и моноглицериды, ЛК, линоленовая кислота и ГМЛ проявляли большую бактерицидную активность, когда их культивировали в среде для инфузии мозга и сердца при рН 5. Интересно, что бактерицидная активность нескольких жирных кислот зависела от рН раствора, причем активность увеличивалась при рН 5 по сравнению с рН 6, в то время как на активность моноглицеридов рН раствора в этом диапазоне не влиял. Таким образом, эта гипотеза согласуется с ионизируемой головной группой жирных кислот, в то время как моноглицериды являются неионными молекулами [95,110,111].

Helicobacter pylori - еще одна бактерия-мишень, чувствительная к жирным кислотам; этот патоген представляет собой грамотрицательную бактерию, которая может вызвать тяжелую инфекцию в желудке или двенадцатиперстной кишке, приводящую ко многим заболеваниям, таким как язва желудка, хронический гастрит и рак желудка. В нескольких исследованиях было задокументировано, что жирные кислоты и их производные ингибируют и уничтожают *H. pylori in vitro* и *in vivo* [103,112–114]. Аналогичным образом, результаты ЛК и ГМЛ, реализованные Sun *et al.*, [108] против *H. pylori*, где оценивали активность таких выбранных ненасыщенных жирных кислот наряду с рядом насыщенных жирных кислот (4-16 углеродных цепей) и моноглицеридов (12-16 углеродных цепей).

ЛК полностью уничтожал *H. pylori* при минимальной смертельной концентрации (МБК) 1 мМ, в то время как ГМЛ проявлял более высокую активность, чем ЛК с МБК 0,5 мМ. Кроме того, ненасыщенные жирные кислоты миристолевой (C14:1) и линоленовой кислот обладают наиболее мощной активностью среди других ненасыщенных жирных кислот против *H. pylori* [108]. Кроме того, Bergsson *et al.* [115] также оценили ингибирующую активность широкого спектра жирных кислот и их моноглицеридов в отношении грамотрицательных бактерий, включая *H. pylori*. Интересно, что жирные кислоты с длиной углеводородных цепей в диапазоне от 10 до 16 атомов углерода проявляли ингибирование *H. pylori* при концентрации 10 мМ, в то время как в отношении видов *Salmonella* и *Escherichia coli* не наблюдалось значительной активности. Было

проведено несколько дополнительных исследований с целью оценки антибактериальных свойств выбранных антимикробных липидов в отношении различных штаммов бактерий, и было указано, что монокаприн (МГ C10:0) проявлял самую высокую бактерицидную активность в отношении *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*. Были проведены дополнительные исследования для изучения влияния углеводородной цепи жирных кислот в диапазоне от 2 до 18 атомов углерода на *E. coli* как грамотрицательные бактерии и виды *Salmonella* [116,117], и они показали, что каприловая кислота (C8:0) проявляет высокую антибактериальную активность в отношении этих бактерий. Кроме того, каприловая кислота и ее моноглицерид монокаприлат продемонстрировали заметную антибактериальную активность в отношении патогенных для рыб бактерий *Edwardsiella* spp. [118]. Особо следует отметить, что каприловая кислота и монокаприлат проявляли достаточную активность в отношении наиболее важных патогенов пищевого происхождения, включая *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., и *L. monocytogenes* [119,120].

Метициллин-устойчивый *S. aureus* (MRSA) ответственен за возникновение кожных инфекций, включая острые бактериальные инфекции кожи и структуры кожи, которые подавлялись насыщенными жирными кислотами, Kitahara *et al.* [121] исследовали широкий спектр насыщенных жирных кислот против чувствительного к метициллин-чувствительных *S. aureus* (MSSA) и устойчивого золотистого стафилококка (MRSA). Было обнаружено, что ЛК является наиболее мощной насыщенной жирной кислотой против MRSA, в то время как ГМЛ проявляет высокую активность против *S. aureus*. Кроме того, Lin *et al.* [122], сообщили, что ГМЛ эффективно убивал бактерии, протестированные *in vitro* и *in vivo*, что еще больше уменьшало синдром токсического шока. В другом исследовании *in vivo*, проведенном Preuss *et al.* [123], подчеркивалась антибактериальная активность ГМЛ в отношении патогенной инфекции *S. aureus* человека. Более того, Nakatsujii *et al.* [99] заявили, что ЛК эффективен для лечения мыши, инфицированной грамположительной бактерией, особенно *Propionibacterium acnes*. Следовательно, в недавних исследованиях было продемонстрировано, что множественные антимикробные липиды обладают ведущей антибактериальной активностью в терапевтическом потенциале *in vivo*, и были проведены обширные исследования по изучению комбинаций нескольких антимикробных липидов с высокой антибактериальной активностью против бактерий-мишеней для получения синергических эффектов широкого спектра действия [124–128].

1.3.2. Механизмы антибактериальной активности жирных кислот

1.3.2.1. Проницаемость мембран и лизис клеток

Механизмы антибактериальной активности жирных кислот и их производных, в частности моноглицеридов, были исследованы с использованием различных экспериментальных методов.

Чтобы определить эти подходы, противомикробные агенты должны быть в основном нацелены на мембраны бактериальных клеток и нарушать ключевые процессы, участвующие в защите и функционировании клеток. Жирные кислоты и моноглицериды обладают амфипатическими свойствами, которые способны нарушать мембрану бактериальной клетки, что приводит к нарушению биофизических явлений, таких как повреждение мембраны и образование пор. В частности, мембраностабилизирующая активность увеличивает проницаемость клеток и лизис клеток, что приводит к ингибированию роста бактериальной культуры (бактериостатическое действие) или гибели бактериальных клеток (бактерицидное действие) [95,96].

Среди основных процессов, участвующих в мембранах бактериальных клеток, два важных процесса включают в себя цепочку переноса электронов и окислительное фосфорилирование, которые важны для производства энергии в бактериальных клетках. Эти два процесса взаимосвязаны, и жирные кислоты обладают потенциалом замедлять процесс цепи переноса электронов, соединяясь с переносчиками электронов или изменяя целостность мембраны, а также препятствуя окислительному фосфорилированию за счет снижения мембранного потенциала и градиента протонов. Более того, жирные кислоты могут непосредственно инактивировать мембранные ферменты, особенно глюкозилтрансферазу, вероятно, из-за сходства между жирными кислотами и низкомолекулярными ингибиторами в молекулярных структурах [129], поэтому они являются мишенью для других мембраносвязанных белков [130]. На рисунке 6 представлена схематическая демонстрация антибактериального механизма действия жирных кислот и моноглицеридов, которые связаны с нацеливанием на мембраны бактериальных клеток. Специфика механических процессов разделена на три аспекта в зависимости от взаимосвязи между ними: (1) повышение проницаемости мембраны и лизис клеток, (2) нарушение цепи переноса электронов и разобщение окислительного фосфорилирования и (3) инактивация мембранных ферментов и поглощение питательных веществ.

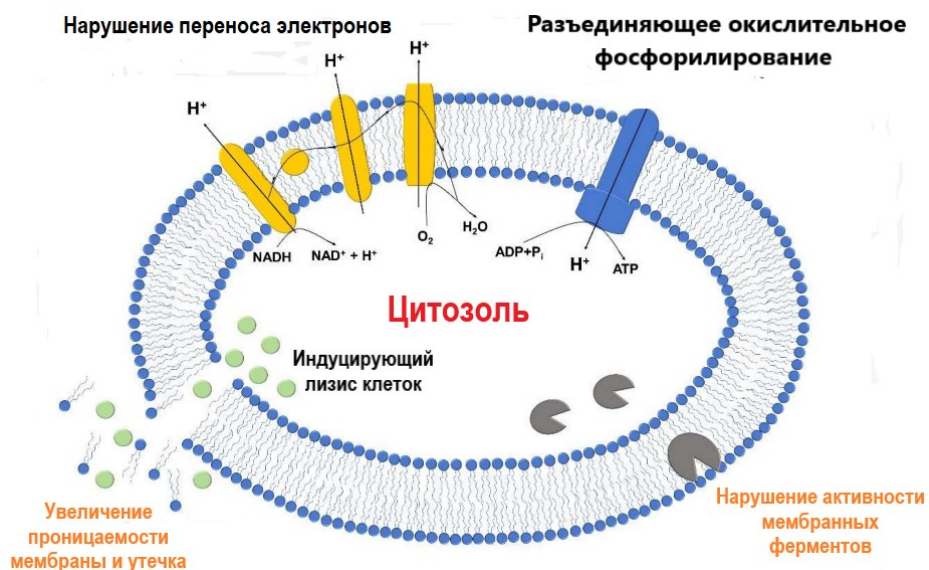


Рисунок 6. Схематическое изображение описывает предполагаемые механизмы антибактериальной активности жирных кислот и моноглицеридов, модифицированных Yoon *et al.* [95].

Взаимодействие антимикробных жирных кислот с мембранами бактериальных клеток может разрушить мембрану и увеличить проницаемость мембраны, тем самым вызывая утечку цитозольных компонентов. В крайних случаях повышенная проницаемость и дестабилизация мембран, скорее всего, приводят к лизису клеток [97]. Cartron *et al.* [131] наблюдали увеличение проницаемости мембран, текучести и целостности клеточных мембран *S. aureus*, измеренных при обработке бактериальных клеток цис-6-гексадекановой кислотой. Обработка олеиновой кислотой снижала величину поляризации, что свидетельствовало о повышенной текучести мембран и приводило к гибели клеток. Аналогичные исследования показали, что обработка ПНЖК вызывала разрушение клеточных мембран *E. coli* [132]. Кроме того, обработка монокаприлином вызывала утечку мембраны, что было подтверждено измерением высвобождения цитоплазматических материалов при 260 нм, что связано с утечкой мембраны бактериальной клетки. Таким образом, проведенные измерения показали, что монокаприлин ингибирует *S. aureus* и *E. coli* бактерий за счет увеличения проницаемости мембраны, что подтверждается морфологическими изменениями или изменениями клеточных компартментов, и наблюдался лизис клеток [133].

В частности, цис-6-гексадеценановая кислота ингибировала рост бактериальных клеток за счет ускорения проницаемости мембраны, что оценивалось путем мониторинга оттока ионов калия и электрического потенциала трансмембранной бактериальной клетки. Увеличение проницаемости привело к увеличению оттока K^+ и снижению потенциала мембраны. Помимо биохимических методов, во многих исследованиях было заявлено об использовании электронной микроскопии для изучения утечки мембран различных типов бактериальных клеток, вызванной антибактериальными жирными кислотами [115,131]. В большинстве этих исследований обработка высокими концентрациями антимикробных жирных кислот приводит к обширным морфологическим изменениям в мембране бактериальной клетки [109,131]. Кроме того, антибактериальные моноглицериды ингибировали и разрушали мембраны различных типов бактериальных клеток. Что касается прямой визуализации лизиса клеток, томирестиновая кислота индуцирует лизис клеток *L. monocytogenes*, что было показано с помощью электронной микроскопии [109].

1.3.2.2. Разрушение цепи переноса электронов и расщепление окислительного фосфорилирования

Цепь переноса электронов представляет собой сложный процесс, который состоит из носителей электронов и производит источник энергии (АТФ) и связан с окислительным фосфорилированием АТФ-синтазой. АТФ-синтаза и цепь переноса электронов расположены на внутренней мембране грамположительных и грамотрицательных бактерий. Электроны переносятся с одного носителя на другой до тех пор, пока не достигнут кислорода, который является конечным акцептором электронов [96]. Процесс переноса электронов сопровождается переносом протонов (H^+) из цитозоля вовне клетки, создавая градиент протонов через цитоплазматическую мембрану и увеличивая мембранный потенциал, который обеспечивает источник энергии для производства АТФ с помощью АТФ-синтазы. Когда одна из стадий цепи переноса электронов и окислительного фосфорилирования повреждена, бактериальным клеткам трудно получать достаточную энергию для метаболизма; это приводит к подавлению роста бактериальной культуры и, в конечном итоге, к гибели клеток.

Нарушение цепи переноса электронов может быть определено путем измерения поглощения кислорода с помощью установки кислородных электродов типа Кларка. Следуя этому подходу, ЛК и миристиновая кислоты были наиболее сильными антибактериальными насыщенными жирными кислотами, которые способны ингибировать поступление кислорода для *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas phaseolicola*, в то время как ненасыщенная жирная кислота линолевая кислота была наиболее эффективной при гораздо более низких концентрациях (большая эффективность), чем насыщенные жирные кислоты. Более того, влияние активности жирных кислот, проведенное на штамме *Bacillus subtilis* путем измерения поглощения кислорода и концентрации АТФ, показало, что взаимодействие жирных кислот с мембраной бактериальной клетки приводит к снижению целостности мембраны, поглощению кислорода и снижению уровня АТФ [95]. Измерить влияние обработки жирными кислотами непосредственно на перенос носителей электронов в живых бактериях является сложной задачей, следует отметить, что Peters *et al.* [134] исследовали процесс переноса электронов в интактных хлоропластах, продемонстрировав, что пальмитолеиновая кислота (С16:1) в основном ингибирует около 90% системы переноса электронов фотосистемы II. Несмотря на то, что последнее исследование не проводилось на мембранах бактериальных клеток, полученные результаты по-прежнему предоставляют полезную информацию для понимания того, как дестабилизация мембран, вызванная антибактериальными жирными кислотами, в дальнейшем может вызывать серьезные нарушения переноса электронов и препятствовать биохимическим процессам.

1.3.2.3. Ингибирование активности бактериальных ферментов

Ингибирование активности ферментов, связанных с мембраной, является еще одним важным механизмом, с помощью которого антимикробные жирные кислоты разрушают мембраны бактериальных клеток, и было проведено несколько исследований, в которых изучалось влияние обработки жирными кислотами на определенные ферменты бактериальных клеток. Например, Won *et al.* [129] продемонстрировали, что олеиновая кислота ингибирует глюкозилтрансферазу (англ. GTase), которая катализирует выработку глюкана в *Streptococcus sobrinus*, в конечном итоге это приводит к ингибированию роста бактерий. Фермент GTase является важным трансмембранным белком, который отвечает за выработку глюкана в бактериальных клетках и продуцируется *Streptococcus mutans* и *Strep. sobrinus*. Важно отметить, что олеиновая кислота, линолевая кислота и арахидоновая кислота (C20:4), являющиеся ненасыщенными жирными кислотами, проявляют еще более сильное ингибирование активности GTase, в то время как незначительный эффект, вызванный насыщенными жирными кислотами. Это открытие очень важно, поскольку оно подтверждает, что антибактериальные липиды с различными физико-химическими свойствами могут иметь различные способы взаимодействия с мембранами бактериальных клеток. В другом исследовании также было подчеркнуто, что олеиновая кислота может инактивировать GTase, что подтверждает, что ненасыщенные жирные кислоты обладают антибактериальной активностью для ингибирования, по крайней мере частично, мембраносвязанных ферментов [129].

Кроме того, было заявлено, что жирные кислоты и их производные могут нарушать рост бактерий путем инактивации биосинтеза жирных кислот. Действительно, жирные кислоты играют решающую роль в жизни бактерий, поскольку они являются предшественниками необходимых клеточных материалов. Так, линолевая кислота проявляла антибактериальную активность в отношении *S. aureus* путем инактивации бактериальной еноил-ацил-белковой редуктазы-носителя (FabI), которая играет важную роль в процессе удлинения жирных кислот [135]. Аналогичным образом, активность среднецепочечных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в отношении *S. aureus* связан с ингибированием синтеза жирных кислот, и эти результаты показали, что альфа-линоленовая кислота является наиболее эффективными ингибиторами среди протестированных соединений [136]. В какой степени воздействие антибактериальных липидов на бактериальные ферменты все еще нуждается в широком понимании, чтобы прояснить процессы дестабилизации мембран, в то время как очевидно, что воздействие антимикробных жирных кислот на бактериальные мембраны может нарушать ключевые ферментативные активности. В этой области особенно интересно, что ненасыщенные жирные кислоты влияют на бактериальные ферменты, в то время как насыщенные жирные

кислоты обычно оказывают незначительное влияние на те же ферменты. Такие результаты повышают общую мотивацию к созданию измерительных платформ для описания механизма действия и эффективности противомикробных липидов, действующих против фосфолипидных мембран, и для разработки корреляций с биологической активностью.

1.3.2.4. Перекисное и автоокисление

Несколько исследований показали, что антибактериальная активность СЖК обусловлена действием вторичных продуктов распада СЖК. Они могут быть получены путем перекисного окисления, при котором образуются H_2O_2 и активные формы кислорода [137], или автоокисления ненасыщенных жирных кислот, при котором образуются оксипирины и короткоцепочечные альдегиды, которые сами по себе являются эффективными антибактериальными средствами [138,139].

Конечно, конкретные механизмы, с помощью которых отдельные СЖК вызывают ингибирование роста и/или гибель бактерий, будут зависеть от структуры ЖК, бактерии-мишени и участков, к которым СЖК может получить доступ. Эффективный контроль роста и выживания бактерий может включать в себя множество механизмов, на каждый из которых могут прямо или косвенно влиять такие факторы, как рН и температура. Часто неясно, вызваны ли изменения антибактериальной активности, вызванные различными условиями рН и температуры, изменениями растворимости СЖК или эти условия оказывают большее влияние на физиологию и, следовательно, на восприимчивость бактерии-мишени [95,96].

1.4. Жирные кислоты разрушают биопленки патогенных бактерий

Бактериальные биопленки могут быть созданы, когда бактерии организованы в агрегаты. Эти биопленки представляют собой сидячие скопления бактериальных клеток, которые прилипают к биотическим или абиотическим поверхностям, кроме того, они состоят из сложной матрицы, состоящей из внеклеточных полимерных веществ, таких как полисахариды, белки и ДНК, которые окружают клетки. Кроме того, различные патогенные микроорганизмы часто образуют смешанные биопленки, которые еще больше повышают толерантность к противомикробным препаратам [140]. Биопленки гарантируют защиту и устойчивость к внешнему стрессу, например, осмотическому стрессу, высыханию, радиации, иммунной системе хозяина или токсичным биохимическим веществам, например, антибиотикам [141]. Микробные патогены, организованные в биопленки, трудно поддаются лечению из-за их оптимальной защиты. Они индуцируют различные стратегии поддержания высоких концентраций

антибиотиков, что приводит к стойким тяжелым инфекциям [142]. Однако эти явления толерантности к антибиотикам можно обратить вспять, и клетки могут снова стать восприимчивыми к антибиотикам после диспергирования биопленки и возвращения клеток в планктонную фазу. Диспергированные биопленки в сочетании с целевым антибиотиком облегчат борьбу с инфекциями биопленок, что может стать альтернативным подходом к лечению биопленок [143]. Биопленки, образуемые бактериями и грибами, играют ключевую роль в устойчивости к противомикробным препаратам и в различных инфекциях, связанных с устройством.

Было подтверждено, что антимикробная активность различных жирных кислот с концентрациями, в основном превышающими 100 мкг/мл, эффективна против различных микроорганизмов [95,144]. Однако, недавние исследования показали, что жирные кислоты проявляют антибиотическую и противовирусную активность в отношении бактерий и грибов в концентрациях, намного меньших, чем их МПК [145], а различные производные жирных кислот являются важными межклеточными сигналами у различных бактерий, ассоциированных с растениями [146]. Короткоцепочечные жирные кислоты нарушают образование биопленки *Streptococcus gordonii* посредством негативной регуляции сигнального пути, стимулирующего иммунитет пептида [147], кроме того, Kim *et al.* [148] задокументировали, что масло пальметты, лауриновая кислота и миристиновая кислота могут ингибировать биопленку, образованную несколькими видами микроорганизмов.

Сообщалось, что различные жирные кислоты ингибируют биопленки, образующиеся *S. aureus*, включая пальмитиновую кислоту (C16:0), олеиновую кислоту (C18:1), линолевую кислоту (C18:2), эйкозодиеновую кислоту (C20:1) [145,149]. Кроме того, в недавнем исследовании, проведенном Yuuama *et al.* [150], было заявлено, что линолевая кислота проявляет высокую эффективность в ингибировании биопленок золотистого стафилококка.

Альфа-гемолизин (англ. Hla) является основным цитотоксическим агентом и в основном связан с биопленкой, образуемой *S. aureus* [151,152], ингибируется жирными кислотами, поэтому Hla подавляется насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами в высоких концентрациях, что влияет на текучесть мембран *S. aureus* [153]. Кроме того, снижение выработки гемолизина и текучести мембран может предложить и прояснить механизмы действия лауриновой и миристиновой кислот для контроля образования биопленки *S. aureus*.

1.5. Жирные кислоты борются с наиболее важными фитопатогенными бактериями при защите сельскохозяйственных культур

Бактериальные фитопатогены считаются наиболее важными возбудителями болезней растений, оказывающими негативное экономическое воздействие на растениеводство.

Фитопатогены поражают все пищевые растения, колонизируя либо их поверхность, либо ткани [154]. Они вызывают такие симптомы, как пятна, фитофтороз, язвы, гниение тканей и/или гормональный дисбаланс, которые приводят к чрезмерному росту растений, задержке роста, ветвлению корней и эпинастии листьев [154,155]. Бактериальная мягкая гниль, вызываемая пектинолитическими видами *Pectobacterium* (мягкая гниль *Pectobacteriaceae*) и видами *Dickeya* (*Solanum tuberosum*), является одним из основных заболеваний картофелеводства во многих регионах мира, выращивающих картофель [156,157].

Высокое генотипическое и фенотипическое разнообразие этих бактерий вызывало симптомы заболевания у широкого спектра растений-хозяев. Пектобактерии вызывают у растений мацерацию тканей или симптомы гнили. Эти патологии, вызванные выработкой фитопатогеном внеклеточных ферментов, разрушают компоненты клеточной стенки, такие как пектатлиазы и другие пектиназы, целлюлазы и протеазы [158,159]. *Xanthomonas* относится к грамотрицательным бактериям, которые могут поражать такие культуры, как фасоль, рис, цитрусовые и хлопок [160]. *Xanthomonas campestris* pv *campestris* поражает сосудистую систему или мезофилл и вызывает заболевания черной гнилью у крестоцветных культур, таких как горчица, капуста, брокколи, цветная капуста, брюссельская капуста и редис во всем мире [161]. *Dickeya solani* и *Pantoea agglomerans* распространяются среди различных видов хозяев, многих культур, начиная от картофеля и заканчивая бананами, фитофторозом декоративных растений, фруктовых деревьев, кустарников, болезнями мягкой гнили и другими [162].

Персистирующая инфекция увеличивает уровень заболеваемости и смертности во всем мире и является основной причиной рецидивирующих инфекционных заболеваний растений. Таким образом, понимание стратегий выживания бактерий является важным шагом для разработки новых стратегий, полезных для борьбы с болезнями растений. Персистирующие клетки считают большой проблемой быстрое распространение, они могут формироваться в условиях стресса, чтобы выжить, и они представляют собой небольшую долю фенотипических вариантов в изогенной популяции, которая проявляет множественную лекарственную устойчивость, не претерпевая генетических изменений. Кроме того, их можно описать как спящие клетки, которые выживают при лечении противомикробными препаратами за счет ингибирования метаболических функций, нарушаемых этими соединениями [163]. Наличие резистентных и персистирующих клеток у фитопатогенов может быть причиной неспособности искоренить болезни растений, несмотря на интенсивные условия окружающей среды, с которыми сталкиваются фитопатогены, такие как ультрафиолетовое излучение, температура, засуха, защитные реакции растений и антимикробные соединения [164–166]. Кроме того, это также может быть существенной причиной вспышек и рецидивов болезней

сельскохозяйственных культур, даже при частом использовании противомикробных препаратов и других методов борьбы в полевых условиях [167–169].

Одним из хороших примеров рецидива является *Xanthomonas spp*, где медь широко используется для борьбы с этой бактерией, и персистирующие клетки образуются под воздействием стресса, вызванного медью, что способствует их повторному росту [170]. Кроме того, устойчивость к меди также наблюдается в полевых условиях, что приводит к постоянному увеличению использования меди в полевых условиях для борьбы с цитрусовой язвой, но эта инфекция может рецидивировать [171,172]. Этот пример может быть применен к нескольким бактериальным заболеваниям растений, когда медь или антибиотики не способны уничтожить систематическую бактериальную популяцию, и инфекция рецидивирует [167,171]. Следовательно, можно сказать, что существует подходящее условие, ответственное за появление “суперфитопатогенных” бактерий, подобных человеческим супербактериям. Однако, в отличие от патогенных бактерий человека, где существует много исследований, посвященных персистирующим клеткам, случаи персистенции у фитопатогенов и исследования, посвященные этому явлению в полевых условиях, редки.

Однако борьба с заболеваниями, вызываемыми перечисленными выше патогенами, затруднена из-за ограниченной эффективности существующих биологических или химических агентов и устойчивости к длительному чрезмерному использованию антибиотиков [162]. Для искоренения бактериальных заболеваний растений было внедрено несколько разработанных методов, включая химический контроль, устойчивые сорта и биологический контроль. Химический контроль может предотвратить крупномасштабные потери и распространение болезней в посевах, несмотря на то, что эти химикаты и антибиотики имеют ряд недостатков, таких как экотоксичность, биоаккумуляция и неблагоприятное воздействие на нецелевые растения, животных и человека.

Известно, что воздействие этих химических веществ, особенно пестицидов, фунгицидов и т.д., вызывает различные виды рака, респираторные расстройства и гормональный дисбаланс у людей. Кроме того, высокая устойчивость индуцируется бактериями после обработки различными антибиотиками [173]. Для борьбы с болезнями растений применялась комбинация некоторых надежных методов, включая механическую обработку (например, горячей водой, паром, сухим горячим воздухом, солнечным светом) или ультрафиолетовым облучением, а также химическую обработку антибиотиками, природными бактерицидами, или синтетическими антимикробными пептидами [156,174]. Стоит подчеркнуть, что в настоящее время не существует методов, позволяющих искоренить постинфекцию, кроме единственных профилактических мер, которые обычно применяются для ограничения, или устранения их дальнейшего распространения.

В последнее время для борьбы с фитопатогенами используются природные биоактивные соединения, способствующие росту растений, такие как фенольные, терпеноидные или алкалоидные категории [175], такие как хитин, ламинарин, аллицин, терпены, хитозан, нарингин и каррагинаны, которые используются в качестве биопестицидов при органическом выращивании. Среднецепочечные жирные кислоты, включая октановую кислоту, каприновую кислоту и лауриновую кислоту, подавляют различные бактериальные, грибковые и вирусные патогены и широко используются в медицине и ветеринарии [176–179]. Ранние исследования показали возможность использования жирных кислот при бактериальных заболеваниях растений, например, комбинация двух видов *Trichoderma* spp. со смесью жирных кислот со средней длиной цепи была исследована на различных овощных культурах с точки зрения биоконтроля, стимулирования роста, повышения урожайности и качества. Применение этой смеси уменьшило некроз *Botrytis cinerea* до 90% по сравнению с зараженными контрольными растениями. Увеличение урожайности в диапазоне от 25 до 90% было зафиксировано на обработанных томатах, салате и кольраби, по сравнению с необработанными растениями [180].

Многочисленные исследования показали, что различные жирные кислоты благотворно взаимодействуют с растением, повышая не только защитные реакции, но и силу роста растений. Это согласуется с другими исследованиями, которые показали значительное влияние смесей жирных кислот на различные культуры, о чем сообщалось в нескольких исследованиях [181,182]. В частности, *Leuva et al.* [181] показали увеличение сухой массы корней растений огурца и томата после применения смеси пальмитиновой и олеиновой кислот. *Liu et al.* [182], заявили, что смешивание олеиновой кислоты и пальмитиновой кислоты эффективно при лечении болезней растений.

1.6. Использование личинок *H. illucens* в аквакультуре и ветеринарии

Аквакультура — это сектор производства продуктов питания, который постоянно растет во всем мире. В 2014 году было произведено почти 74 миллиона тонн рыбы, что составляет примерно 45% мирового производства продуктов питания на основе рыбы. Из-за растущего спроса на пищевой белок и стагнации дикого улова производство рыбы в аквакультуре расширяется, причем темпы роста превышают 8% в год [183]. Аквакультура сталкивается с рядом проблем, включая разрушение природных экосистем, загрязнение воды, биологическое загрязнение и возникновение различных заболеваний рыб.

Использование противомикробных препаратов в рыбоводстве отражает быстрое развитие аквакультуры во всем мире. Интенсификация аквакультуры для удовлетворения потребностей рынка может привести к росту инфекционных заболеваний, вызываемых патогенными бактериями. Следовательно, противомикробные препараты контролируют возникающие

инфекционные заболевания, хотя их применение должно соответствовать правилам и местным нормам страны, в которой они используются. Бактериальные заболевания рыб обычно лечат антибиотиками, которые со временем приводят к устойчивым бактериям [184]. Отбор устойчивых бактерий тесно связан с лечением антибиотиками, совместным отбором генов устойчивости и процессами перекрестной устойчивости. Водная среда (пресноводная и морская) может служить резервуаром устойчивых бактерий и генов, кодирующих устойчивость к противомикробным препаратам [185]. Аквакультура — это еще один экологический путь к развитию и глобализации устойчивости к противомикробным препаратам. Развитие и распространение устойчивых бактерий в сочетании с остатками антимикробных препаратов в окружающей среде представляют опасный риск для здоровья населения [186]. Устойчивые бактерии, образующиеся при разведении рыбы, вызывают серьезную озабоченность, поскольку люди могут заразиться ими во время работы, или в пищевой цепи, и это представляет собой проблему общественного здравоохранения.

Aeromonas spp. являются наиболее распространенными бактериями в пресных или соленых средах обитания, часто вызывающими тяжелые инфекции у культивируемых видов рыб [187]. Род *Aeromonas* входит в группу грамотрицательных анаэробных бактерий, обитающих в почве и воде. Кроме того, он может быть связан с различными инфекционными заболеваниями, обнаруженными у животных и людей [188], классифицируемыми на две группы: подвижные мезофильные (оптимальный рост между 35 и 37 °C), связанные с различными заболеваниями человека, и психрофильные, немобильные (оптимальный рост между 22 и 25 °C), которые заражают как рыб, так и рептилий [189].

A. hydrophila грамотрицательная палочковидная бактерия, являющаяся ведущим возбудителем септицемии *Aeromonas*, известной как гниль хвоста и плавников. Эта бактерия вызывает тяжелые инфекции у различных видов рыб; кроме того, она может заразить некоторые виды морских рыб [190]. Аэромонады вырабатывают различные типы токсинов, такие как цитотоксический энтеротоксин, цитотонический энтеротоксин, аэролизин и гемолизин. Они также выделяют несколько внеклеточных ферментов, таких как липаза, эластаза, желатиназа, протеаза и ДНКаза. Система секреции, система жгутиков и компоненты биопленки связаны с потенциальной вирулентностью *Aeromonas* spp. [191]. Симптомы этих инфекций включают язвы, вздутие живота, скопление жидкости, анемию и кровотечения, что приводит к массовой гибели рыб по всему миру [190]. В практике ведения сельского хозяйства применяются различные методы для уменьшения распространения инфекции *Aeromonas* spp., такие как вакцинация, хлорирование воды и химиотерапия антибиотиками. Сообщалось, что чрезмерное применение антибиотиков ускоряет появление штаммов *A. hydrophila* множественной лекарственной устойчивостью. гидрофилы в местах обитания аквакультуры [187].

A. salmonicida subsp. *salmonicida* неподвижная грамотрицательная бактерия, вызывающая фурункулез у лососевых рыб. Поэтому он заражает рыбок данио в водной среде и может быстро размножаться в течение нескольких часов после заражения [192]. Бактерии могут быть устойчивы к определенным противомикробным препаратам естественным путем или путем горизонтального переноса генов [193]. Этот патоген может вызвать геморрагический сепсис, язвенные поражения, острое кровотечение и смерть [194].

Множественная лекарственная устойчивость пищевых бактерий является первостепенной проблемой общественного здравоохранения. Чрезмерное использование противомикробных препаратов в аквакультуре может привести к антимикробному загрязнению прибрежной водной среды [195]. Внутренняя резистентность рода *Aeromonas* к бета-лактамам связана с экспрессией хромосомной бета-лактамазы или активацией эффлюксных насосов [196]. В этом роде были идентифицированы гены, которые придают устойчивость к широкому спектру бета-лактамовых антибиотиков. В частности, почти 10,5% *Aeromonas* sp., выделенных из устья реки, обладали генами бета-лактамаз, особенно геном *bla*TEM [197]. Бета-лактамазы расширенного спектра действия (англ. ESBL) кодируются на мобильных генетических элементах, таких как плазмиды, транспозоны и интегроны, которые также содержат гены устойчивости к другим классам противомикробных препаратов [198]. Штаммы, продуцирующие ESBL, могут сопротивляться лечению и увеличивать заболеваемость заболеваниями, связанными с бактериальными инфекциями. Устойчивость по крайней мере к двум классам противомикробных препаратов наблюдается у 59% изолятов необработанной воды [199]. Более того, наблюдалось наличие гена *tet*, кодирующего устойчивость к тетрациклину у 10%, и гена *bla* примерно у 29% изолятов. Ген *tet*, обнаруженный у видов *Aeromonas*, рассматривается как результат сильного антропогенного давления на аквакультуру из-за использования тетрациклина в качестве антимикробного средства [200]. С другой стороны, в Австралии, где никакие противомикробные препараты не лицензированы для использования в аквакультуре, 100% штаммов *Aeromonas*, выделенных из рыбы, несли ген *tet* [201]. Хотя *Aeromonas* sp. представлены типичные характеристики чувствительности к противомикробным препаратам, профили устойчивости варьируются в разных исследованиях из-за специфических особенностей штаммов или избирательного давления окружающей среды [191]. Это привело к необходимости профилирования устойчивости к антибиотикам каждого лабораторного штамма перед сравнением с новыми тестируемыми противомикробными препаратами.

Активация откачивающих насосов является еще одним важным фактором устойчивости *Aeromonas* sp. Система отток *Aeromonas hydrophila* ABC (*Ahe*ABC), кодируемая генами *AheA*, *AheB* и *AheC* *A. hydrophila*, участвует в фенотипе множественной лекарственной устойчивости к

цефуроксиму, цефоперазону, эритромицину, линкомицину, прistinамицину, миноциклину, триметоприму, фузидовой кислоте и рифампицину [202].

За исключением нескольких штаммов и видов *Aeromonas* spp., которые описаны как устойчивые к ампициллину [203]. Эти бактерии также устойчивы к пенициллину и цефалоспориновым группам первого поколения [204,205]. *Aeromonas* spp. может быть чувствителен к монобактамам, карбапенемам, цефалоспорином третьего и четвертого поколений, аминогликозидам и фторхинолонам [39]. Ndi *et al.* [201] сообщили об увеличении резистентности к бета-лактамам противомикробным препаратам (пенициллинам и производным, цефалоспорином, карбапенемам и монобактамам) из-за наличия генов, кодирующих продукцию бета-лактамаз [190]. В последнее время исследования антимикробных профилей у *Aeromonas* spp. участились в связи с необходимостью ответственного применения антибиотиков [206–208].

Контроль и лечение бактериальных заболеваний рыб включают физическую, химическую и биологическую обработку. Физический контроль, такой как карантин, вакцинация, регулирование температуры, использование рекомендуемой плотности хранения, фильтрация и облучение приточной воды ультрафиолетовым (УФ) светом. Кроме того, для борьбы с болезнями *Aeromonas* были соблюдены многочисленные процедуры, такие как снижение стрессовых факторов, включая растворенный кислород, высокую температуру, перенаселенность, правильное питание и поддержание хорошего качества воды, изоляция новой рыбы в карантине и своевременная изоляция больной рыбы, обработка рыбы профилактическими средствами, такими как хлорид натрия, акрифлавин, медный купорос и соль [209]. Вакцины и антибиотики, используемые в аквакультуре для лечения и борьбы с патогенами рыб. Вакцинация важна, поскольку она является одним из основных подходов к профилактике и борьбе с рядом заболеваний в аквакультуре. Большинство вакцин основаны на ингибирующих микроорганизмах и адьювантах, вводимых путем погружения или инъекции. С некоторым успехом предпринимались попытки профилактической иммунизации против бактериальных заболеваний выращиваемой рыбы против *Yersinia ruckeri* и *A. salmonicida*. Однако, несмотря на некоторые успехи, достигнутые в результате вакцинотерапии, вакцин против многих патогенов не существует. Кроме того, разработка новых рыбных вакцин очень дорога и непрактична для личинок рыб, которые обычно более восприимчивы к болезням и не могут индуцировать специфический иммунитет.

Чтобы преодолеть эти проблемы в аквакультуре, антимикробные препараты используются для лечения бактериальных заболеваний рыб. Хотя антибиотики проявляют высокую селективность в уничтожении рыбных бактерий, но появилось несколько проблем, таких как устойчивость бактерий к различным типам классов антибиотиков из-за использования антибиотиков в низкой концентрации (<МПК). Переход остатков противомикробных

препаратов, устойчивых к противомикробным препаратам бактерий и генов устойчивости из водных ниш к наземному скоту и людям привел к высокому риску широкого распространения лекарственной устойчивости. Биологический контроль с помощью фаговой терапии представляется экологически чистым и эффективным решением для борьбы с патогенными бактериями в аквакультурах, однако только один продукт на основе фагов, называемый BAFADOR®, был одобрен для борьбы с *Pseudomonas* spp. и *Aeromonas* spp. в аквакультуре [3,210].

Подводя итог, можно сказать, что контроль и лечение бактериальных заболеваний в аквакультуре становятся все более сложными по многим причинам, в том числе: (i) загрязнение фекалиями вод рыбоводных хозяйств из-за ограниченного количества лекарств, лицензированных для использования в рыболовстве, и многих противомикробных средства, которые неэффективны против эндоспор и зооспор, что приводит к неэффективности лечения в случае инфекции; (ii) неподходящие условия окружающей среды, такие как высокие повышенные температуры, колебания солености, снижение содержания растворенного кислорода, высокая нагрузка органическими материалами, которые увеличивают вспышки заболеваний; (iii) высокая плотность рыбы, что является обычной практикой в аквакультуре, приводящей к снижению устойчивости к инфекциям; (iv) различные стадии жизненного цикла рыбы, которые влияют на развитие их иммунной системы; (v) неконтролируемое использование антибиотиков, что увеличивает проблему устойчивости распространенных патогенных бактерий и беспокойства по поводу распространения антибиотиков в окружающей среде [210].

Частичная или полная замена питания ЛМЧЛ рыбы была успешно продемонстрирована у различных видов рыб, включая радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*); японского морского окуня (*Lateolabrax japonicus*); атлантического лосося (*Salmo salar*); европейского морского окуня (*Dicentrarchus labrax*); гибридную тилапию и маррона (*Cherax cainii* и *Monopterus albus*) [211]. Замена рыбной муки на муку ЛМЧЛ оказывает значительное влияние на рост, гематологию и иммунитет к кожной слизи нильской тилапии [212,213].

Животноводческие фермеры обычно использовали антибиотики в кормах для животных, чтобы улучшить продуктивность животных и получить высокий выход животных белков. Однако чрезмерное использование антибиотиков в кормах для животных привело к высокому уровню лекарственной устойчивости бактерий и снижению качества мясных продуктов. Использование антибиотиков в животноводстве запрещено во многих странах из-за неблагоприятных последствий. Таким образом, были проведены обширные исследования с целью поиска ценных альтернатив антибиотикам. Недавние исследования показали, что насекомые являются устойчивым источником корма для животных во многих странах мира благодаря их способности обеспечивать пищевые ингредиенты [214]. Насекомые обладают

большой эффективностью в преобразовании состава корма, чтобы использовать питательные вещества рациона лучше, чем животные. Кроме того, насекомые производят меньше отходов, особенно аммиака, и выделяют меньше газов, чем домашний скот. Кормление насекомых несъедобными для человека органическими отходами, а затем выращивание домашней птицы с помощью этих насекомых, таким образом, привело к увеличению содержания белка у этих животных [215]. Было высказано предположение, что *H. illucens* уменьшают количество патогенных бактерий (*Escherichia coli* 0157:H7 и *Salmonella enterica*) в птичьем помете [216], поэтому ЛМЧЛ обладает профилактическими свойствами, стимулируя неспецифические иммунные реакции, а также снижая бактериальную нагрузку против *Salmonella gallinarum* [217]. Лауриновая кислота с кокосовым маслом показала высокую активность в отношении трех патогенов рыбы (*Aeromonas hydrophila*, *Saprolegnia parasitica* и *Ichthyophthirius multifiliis*). НЖК и ПНЖК усиливают иммунные реакции радужной форели [218].

Дизентерия свиней является экономически важным с ветеринарной точки зрения заболеванием, которое значительно поражает свиней на откорме, вызывая замедление роста и низкую конверсию корма при низком уровне смертности. Кроме того, у животных могут проявляться серьезные симптомы, такие как слизисто-геморрагическая диарея с колитом. *Brachyspira hyodysenteriae* - грамотрицательная спирохета, привередливая, и ее трудно выделить и культивировать *in vitro* из фекалий инфицированных свиней. По этой причине анализы чувствительности к антибиотикам трудно валидировать без надлежащей бактериальной изоляции, поэтому обычно индуцируется распространение устойчивых к антибиотикам бактерий [219]. Wang и Shelomi [215] заявили, что мухи *H. illucens* уменьшают массу и содержание питательных веществ в свином навозе, который похож на птичий помет, кроме того, эти личинки уменьшают загрязнение питательными веществами и популяцию мух-вредителей в стоке, что улучшает гигиену фермы. ЛМЧЛ можно выращивать на навозе молочных коров, который часто смешивают с другими материалами для улучшения выхода личинок и общего сокращения отходов из-за высокого содержания сырой клетчатки в чистом молочном навозе, который иначе мухи не могут полностью переварить. Мастит крупного рогатого скота является серьезной экономической проблемой для молочной промышленности во всем мире. Известно также, что каприловая кислота, короткоцепочечная жирная кислота, и ее моноглицерид инактивируют патогенные микроорганизмы мастита, включая *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uber*, *S. aureus* и *E. coli*. Основываясь на этих результатах, каприловая кислота или монокаприлин являются хорошим кандидатом для лечения мастита крупного рогатого скота [102].

1.7. Жир личинок *H. illucens* уничтожает штаммы патогенных бактерий МЛУ человека

Микробные заболевания являются основной причиной смертности, а устойчивые микроорганизмы угрожают общественному здравоохранению во всем мире [220,221]. В настоящее время число смертей ежегодно увеличивается и достигает 700 000 из-за устойчивых микробов. Ожидается, что к следующим трем десятилетиям микробы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) будут вызывать более десяти миллионов смертей в год [222]. Внутрибольничные бактерии включают *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* sp. известны как организмы “ESKAPE” [223]. Эти организмы или супербактерии возвращаются в новых формах, чтобы быть устойчивыми почти ко всем клинически значимым противомикробным препаратам.

Значительный рост заболеваемости МЛУ и чрезвычайно устойчивыми к лекарственным средствам патогенами группы *Enterobacteriaceae* в настоящее время представляет глобальную экономическую угрозу [222]. В настоящее время карбапенемы, такие как имипенем, меропенем и эртапенем, рекомендуются в качестве антибиотиков первой линии для лечения серьезных инфекций, вызванных бактериями МЛУ [224,225]. К сожалению, неизбирательное, неразумное применение карбапенемов привело к появлению бактерий, устойчивых к этим антибиотикам последней инстанции [226]. В настоящее время присутствие NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase-1) в бактериях является одним из наиболее клинически и эпидемиологически важных механизмов резистентности к карбапенемам. Разработка новых лекарств и новых стратегий крайне необходима и подчеркивается всемирной организацией здравоохранения WHO для борьбы с устойчивостью к антибиотикам [221,227], что постоянно требует поиска новых биологически активных соединений в области натуральных продуктов. Более эффективные и более доступные препараты с менее токсичными побочными эффектами пользуются большим спросом для лечения МЛУ-инфекций [228].

Klebsiella pneumoniae, грамотрицательные палочковидные бактерии, принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae*, являются оппортунистическим патогеном с множественной лекарственной устойчивостью, вызывающим треть всех грамотрицательных внутрибольничных инфекций [229]. Факторы вирулентности различных патогенных бактерий, таких как штаммы *E. coli*, *S. aureus* и *K. pneumoniae*, включают капсульные полисахариды, липополисахариды, адгезины фимбрий и сидерофоры, которые имеют решающее значение для выживания бактерий [230–232]. Пути передачи клебсиеллезных инфекций очень разнообразны, включая дыхательные пути, вызывающие пневмонию, кровь, вызывающую бактериемию, и контакты от человека к человеку через загрязненные руки. *Klebsiella* spp. может распространяться очень легко и быстро, но не по воздуху. Кроме того, медицинские учреждения, которые наиболее уязвимы для

заражения клебсиеллой у пациентов, находятся на аппаратах искусственной вентиляции легких, катетерах или имеют хирургические раны. Заражение *K. pneumoniae* в основном возникает в легких, вызывая некроз, воспаление и кровоизлияние в легочную ткань из-за проникновения аспирированных микроорганизмов из ротоглотки в нижние дыхательные пути. Инфекционная доза у человека почти неизвестна, кроме того, инкубационный период до конца не изучен, хотя и проявляется в течение нескольких дней. Таким образом, госпитальные инфекции, вызванные *K. pneumoniae*, могут возникать в разных частях тела и при различных формах заболевания в зависимости от процесса передачи [233,234].

В последние десятилетия был описан новый тип гипервирулентного *K. pneumoniae*, приобретенного сообществом (hvKp), вызывающего опасные для жизни инвазивные инфекции [235,236]. Отличительной особенностью большинства штаммов hvKP является гипермуковязкость, которая обусловлена перепроизводством капсульных полисахаридов и экспрессией гена плазмидного регулятора мукоидного фенотипа А (*rmpA*) и гена активатора транскрипции *rmpA2* [237]. Среди более чем восьмидесяти капсульных серотипов *K. pneumoniae*, выявленные на сегодняшний день, серотипы K1 и K2 считались причиной наиболее тяжелых инфекций hvKP [233,238].

1.8. Цитотоксичность жирных кислот

Жирные кислоты и моноглицериды, экстрагированные из *Acacia dealbata*, показали низкую цитотоксичность или ее отсутствие, когда их тестировали против различных клеточных линий, включая нейробластоми мышши, кератиноцит человека, фибробласт мышши [239]. Кроме того, в другом исследовании Petropoulos *et al.* [240] сообщалось, что растительные масла из портулака, льняного семени, семян люффы и тыквы содержат высокий процент жирных кислот, которые показали значительный эффект против двух типов раковых клеточных линий, а именно *Henrietta Lacks* (HeLa (карцинома шейки матки) и NCI-H460 (не-мелкоклеточный рак легкого), в то время как проявлял умеренную токсичность в отношении неопухолевых клеток (клеточная линия PIP2). Однако результаты, полученные Vilakazi *et al.* [241], не проявляли цитотоксического действия на нормальные клетки при обработке экстрактами, богатыми ПНЖК, из *Chlorella* sp. Кроме того, липиды, извлеченные из мозга толстолобика, обладают защитным действием против окислительного повреждения клеток ЭПЧ-293 [234].

Глава 2. Экспериментальные методы исследования

2.1. Биологические материалы

Жир был выделен из живых личинок *Hermitia illusinus* 15-дневного возраста методом механического прессования, предоставлен компанией ООО «НордтехСад», (Архангельск, Россия), который использовался для этого исследования. Клеточная линия ЭПЧ-293 (эмбриональная почка человека) была получена из американской коллекции культур (англ. ATCC, Манассас, Вирджиния, США).

Штаммы бактерий, использованные в данном исследовании *Klebsiella pneumoniae* susp. *Pneumonia* ATCC ВАА-2473, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Pantoea agglomerans* ATCC 27995, *Xanthomonas campestris* subsp. *Campestris* ATCC 13951, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* ATCC 15713, *Pectobacterium atrosepticum* ATCC ВАА-672D, *Dickeya solani* NCBI IPO 2222, *Staphylococcus aureus* ATCC 55804, *Acinetobacter baumannii* ATCC ВАА-2900 штаммы были приобретены в Американской коллекции типовых культур (англ. ATCC), Манассас, США. Экологический изолят *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* КРМ9 и клинические изоляты *Klebsiella pneumoniae* susp. *pneumoniae* КРi1627 были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГЦПМ, Оболенск, Россия).

2.2. Химические реагенты

В этом исследовании использовались различные химические вещества, в том числе соляная кислота (HCl), уксусная кислота (CH₃COOH), метанол (CH₃OH), этанол (C₂H₅OH), четыреххлористый углерод (CCl₄), диметилформамид (ДМФА), гексан (C₆H₁₄), дихлорметан (CH₂Cl₂), хлороформ (CHCl₃), формальдегид (CH₂O), ацетонитрил (CH₃CN) и изоамиловый спирт (C₅H₁₁OH), этилацетат (C₄H₈O₂), ацетон (C₃H₆O) и толуол (C₇H₈), которые были приобретены у Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США. Кристаллический фиолетовый, йодид пропидия, бромид этидия (EtBr), глутаровый альдегид, фосфатный буферный физиологический раствор (англ. ФБР), тетроксид осмия, эпоксидная смола, уранилацетат и глюкоза, приобретенные у Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США. Для определения жизнеспособности клеток использовали набор Almar blue (Thermo Scientific, США), набор Vialight MDA Plus (Lonza Rockli, Inc, США). МТТ (3-[4, 5-диметилтиазол-2-ил]-2, 5-дифенилтетразолий бромид) и ДМСО были приобретены у Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США.

Коммерческие и готовые диски с антибиотиками диаметром 6 мм, используемые для определения чувствительности к антибиотикам, таким как пенициллин-стрептомицин (10 мкг/диск), хлорамфеникол (Хл) (30 мкг/диск), гентамицин (Г) (10 мкг /диск) и доксициклин (30 мкг/диск), приобретенные у Gibco, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США. Пенициллин (П) (2U/диск), ванкомицин (ВА) (5 мкг/диск), эритромицин (Э) (60 мкг/диск), рифампицин (РД) (15 мкг/диск), канамицин (К) (1000 мкг/диск) и колистин (КТ) (10 мкг/диск), ципрофлоксацин (Цеп) (5 мкг/диск), левофлоксацин (Лев) (5 мкг/диск), цефепим (Цеф) (30 мкг/диск), и ампициллин (Амп) (200 мкг/диск), были приобретены у Oxoid, Бейсингсток, Хэмпшир, Великобритания.

2.3. Питательные среды

Следующие микробиологические среды были приобретены у Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США, включая агар Лаури Brentani (ЛБ), были использованы для выращивания бактерий. ЛБ содержит агар 15 г/л, NaCl 10 г/л, триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, и был приготовлен путем растворения 40 г в 1 л d.H₂O. Бульон ЛБ, часто используемый для культивирования бактерий в жидких средах, состоит из 10 г/л NaCl, 10 г/л триптона и 5 г/л дрожжевого экстракта и был приготовлен путем растворения 25 г в 1 л d.H₂O.

Агар Мюллера Хинтона (МХ), также используемый для культивирования бактерий на твердых средах, состоит из 17 г/л агара, 2,0 г/л сухого вещества для настоя говядины, 17,5 г/л гидролизата казеина и 1,5 г/л крахмала; его получают путем растворения 38 г в 1 л d.H₂O. Компоненты бульона МХ составляют 2,0 г/л сухого вещества говяжьего настоя, 17,5 г/л гидролизата казеина и 1,5 г/л крахмала, приготовленного путем растворения 21 г в 1 л d.H₂O, и его использовали для культивирования бактерий на жидких средах для использования в следующих микробиологических экспериментах.

Триптоновый соевый агар (ТСА) (Oxoid, Бейсингсток, Хэмпшир, Великобритания) использовали для определения подергивающей подвижности бактерий; он состоял из панкреатического перевара 15 г/л, ферментативного перевара соевых бобов 5 г/л, хлорида натрия 5 г/л, и агара 15 г/л; далее его готовили путем растворения 40 г в 1 л d.H₂O. Пептон, триптон и NaCl были приобретены у (Sigma-Aldrich, США), в то время как дрожжевой экстракт был приобретен у Difco, США, и использовался для приготовления питательных сред для проверки подвижности бактерий. рН всех питательных сред регулировали на уровне 7,2±0,2, и все среды подвергали автоклавированию при 121 °С в течение 15 мин.

2.4. Условия культивирования бактерий

Все штаммы бактерий хранятся в стерильном глицериновом растворе (30%, об/об) при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ для длительного хранения. По одной колонии от каждого штамма инокулировали в 10,0 мл бульона ЛБ, инкубировали в течение ночи при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ для наиболее надежных штаммов. Патогены рыб (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*) и фитопатогенные штаммы (*Pantoea agglomerans* (Pagg) (ATCC 27995), *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (Xcc) (ATCC 13951), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pbc) (ATCC 15713), *Pectobacterium atrosepticum* (Pba) (ATCC BAA-672D) и *Dickeya solani* (Dsol) (NCBI IPO 2222) инкубировали ночь при $28\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ путем перемешивания при 200 об/мин. Ночную культуру обычно доводили до мутности, эквивалентной стандарту 0,5 по McFarland 1×10^8 КОЕ/мл) для каждого штамма и использовали в анализах на чувствительность. Все эксперименты проводились в стерильном кабинете биобезопасности (Safe Fast Elite, Феррара, Италия).

2.5. Экстракция жира из личинок *H. illucens*

Экстракт жира личинок *H. illucens*, полученный с использованием кислого водного раствора метанола и приготовленный путем обработки 3 г жира личинок 10 мл смеси воды (качество Milli Q), метанола (99,9%, класс ВЭЖХ) и соляной кислоты (37%) в соотношении (90:9:1) при pH 1. Вкратце, 3 г личинок плавил в 10 мл экстракционного раствора под горячей водопроводной водой ($52\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 5,0 мин, затем тщательно гомогенизировали с помощью vortex V-1 (BIOSAN, Латвия) в течение 10,0 мин и подвергали экстракции на орбитальном шейкере Mixmate (Eppendorf AG, Гамбург, Германия) при 2000 об/мин в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем смесь обрабатывали ультразвуком при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10,0 мин (Elmasonic S 30H, Зинген, Германия), затем окончательно гомогенизировали с помощью гомогенизатора ULTRA TURRAX-25 (IKA, Deutschland, Германия) при 17000,0 об/мин в течение 10 мин. Нерастворимый жир отделяли центрифугированием при $4000 \times g$ в течение 20 мин при комнатной температуре (центрифуга, Eppendorf AG, Гамбург, Германия).

Собранный супернатант был использован для будущих экспериментов в этом исследовании. Процесс экстракции последовательно повторяли три раза, добавляя по 10 мл экстракционного раствора к оставшемуся жировому осадку. Затем супернатанты проверяли отдельно или объединяли вместе, и концентрировали под вакуумом (Concentrator plus, Eppendorf AG, Гамбург, Германия) при $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 13 ч. Концентрированный экстракт хранили при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до тех пор, пока это было необходимо.

2.6. Определение антимикробных свойств экстрактов из жира личинок *H. illucens*

2.6.1. Анализ диффузии агарового диска

Диаметр зоны ингибирования (ДЗИ) для выбранных штаммов бактерий проводили в соответствии с методом дисковой диффузии, каждый штамм культивировали и инкубировали в соответствии с условиями культивирования, чашки Петри МХ Агар были пропитаны бактериальной культурой с помощью ватного тампона. Затем 50 мкл раствора экстракта добавляли на диски диаметром 6 мм в стерильных условиях с последующей сушкой при комнатной температуре в течение 30 мин. В качестве отрицательного контроля использовали 50 мкл реагента для экстракции (КВМ), а в качестве положительного контроля использовали 50 мкл антибиотиков (пенициллин–стрептомицин или доксициклин), приготовленных в определенной концентрации в соответствии с методами института стандартов клинических лабораторий (англ. CLSI). ДЗИ, окружающие диски, измерялись каждые 12 часов.

2.6.2. Турбидиметрический анализ

Ночные бактериальные культуры доводили до плотности 1×10^6 (КОЕ/мл) в свежем бульоне ЛБ. Экстракт жира личинок подвергали двукратному разведению в бульоне LB путем добавления 100 мкл исходного экстракта с концентрацией 50 мг/мл в первую лунку с последующим последовательным разведением для получения ряда соответствующих концентраций КВМЭ в виде 25, 12.5, 6.25, 3.13, 0.78, 0.195, 0.097, и 0,00 мг/мл в лунках. После этого в каждую лунку 96-луночного планшета (ТРР, Трасадинген, Швейцария) загружали по 100 мкл фитопатогенных бактерий с концентрацией 1×10^6 (КОЕ/мл). Отрицательный (100 мкл реагента для экстракции КВМ) и положительный (100 мкл пенициллин-стрептомицина (П/С) с концентрацией 50 мкг/мл) контрольные образцы подвергали двукратным разведениям.

Турбидиметрический анализ патогенных рыбных бактерий (*A. Hydrophila* и *A. salmonicida*) проводили тем же способом, что и упомянутый выше, где диапазон концентраций КВМЭ3 составлял 0.012, 0.024, 0.048, 0.095, 0.19, 0.38, 0.75, и 1,5 мг/мл. В качестве положительного контроля использовали доксициклин (ДОК); его подвергали той же процедуре для получения конечной концентрации 0,008–1,0 мкг/мл для *A. hydrophila* и от 0,19 мкг/мл до 25 мкг/мл для *A. salmonicida*.

Турбидометрический анализ патогенных бактерий человека (*K. pneumoniae* КРi1627, *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* АТСС ВАА-2473) проводили таким же образом, где КВМЭ3 тестировали в диапазоне от 2 мг/мл до 0,0156 мкг/мл, в то время как КВМЭ3 тестировали против *S. aureus* АТСС 55804, и *A. baumannii* АТСС 19606 в диапазоне 0,012-1,5 мкг/мл. Аналогичным образом, положительный контроль (доксициклин) последовательно разбавляли 2-кратным

разведением в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,195 мкг/мл против всех штаммов *K. pneumoniae*. Пенициллин-стрептомицин (П/С) был протестирован против *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 в диапазоне 0,6-78,125 мкг/мл. Каждое разведение использовалось в трехповторах. Затем планшеты покрывали пленкой, и каждый штамм инкубировали в соответствии с условиями культивирования, раздел 2.4. Оптическую плотность измеряли с интервалом каждые 2 ч от 0 ч до 24 ч при ОП₆₀₀ нм с помощью считывателя микропланшетов CLARIOstar (BMG LABTECH, Ортенберг, Германия).

2.6.3. Определение минимальной концентрации подавления (МПК) с помощью турбидиметрического анализа

МПК были определены визуально как самая низкая концентрация КВМЭ, которая была способна ингибировать рост бактерий. Эксперимент проводился в стерильных условиях, чтобы избежать любых нежелательных бактериальных загрязнений. Каждый штамм культивировали, готовили и инкубировали в соответствии с условиями культивирования, раздел 2.4.

2.6.4. Определение половины подавления концентрации (МПК50)

Значение МПК50 рассчитывали по результатам турбидиметрического анализа через 6 ч, 12 ч и 24 ч. Вкратце, 100 мкл бактериальной суспензии с конечной плотностью 5×10^5 (КОЕ/мл) добавляли в 96-луночные планшеты, которые содержали аликвоту из 100 мкл жирового экстракта личинок *H. illucens* и положительный контроль (П/С) разводили в бульоне LB, как указано выше в разделе 2.6.2. Для каждого образца определяли МПК50 с использованием режима нелинейной регрессии программного обеспечения Graph Pad Prism™ версии 6.07 (Graph Pad Software, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Значения МПК50 выражены как ингибирующая доза КВМЭ, которая уменьшила рост тестируемых бактерий на 50%, по сравнению с контролем необработанных бактерий.

2.6.5. Определение минимальной бактерицидной концентрации (МБК)

МБК для КВМЭ и положительного контроля (П/С или ДОК) определяли в соответствии со значениями МПК. Таким образом, 30 мкл смеси из 1× МПК, 2× МПК и 4× МПК лунок для анализа на туберкулез подвергали субкультивированию на чашках с МН-агаром, инкубировали в течение 24 ч в соответствии с условиями культивирования для каждого штамма. Чашки с агаром МН дополнительно инкубировали в течение 48 ч. Самая низкая концентрация экстрактов КВМЭ, при которой не наблюдалось роста бактерий или подавления роста на 99,99%, была принята в качестве МБК для этого штамма.

2.7. Оценка множественной лекарственной устойчивости

Чувствительность к противомикробным препаратам определяли с использованием метода дисковой диффузии. Каждый штамм был классифицирован как чувствительный (Ч), промежуточный (П) и устойчивый (У) в соответствии с контрольными точками CLSI, 2018. Были измерены диаметры зон ингибирования (ДЗИ) по сравнению с показателями, указанными в руководящих принципах CLSI [235]. Штаммы, устойчивые к трем или более классам антибиотиков, были определены как с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), штаммы, устойчивые ко всем тестируемым категориям, за исключением 2 категорий антибиотиков, были классифицированы как с обширной множественной лекарственной устойчивостью (ШЛУ), в то время как штаммы, устойчивые ко всем категориям антибиотиков, были классифицированы как панрезистентности (pandrug resistance, PDR) [236]. Все значения данных записывались через 12 ч и 24 ч инкубации.

2.8. Анализ бактериальной устойчивости

Бактериальную устойчивость к КВМЭЗ, выделенному из жира личинок *H. illucens*, определяли после определения значений МПК КВМЭЗ и тестируемых антибиотиков. Штаммы МЛУ-бактерий человека подвергали субкультивированию с концентрацией КВМЭЗ 0,125 МПК (31,25 мкг/мл) и положительным контролем (П/С) в течение 16 дней подряд, чтобы исследовать их способность развивать устойчивость к тестируемым лекарственным средствам. Вкратце, бактериальные культуры собирали в середине логарифмической фазы, трижды промывают фосфатным буферным раствором (ФБР) (рН 7,4) и разбавляли до 5×10^5 (КОЕ/мл) в свежей среде ЛБ, содержащей 0,125, 0,5, 1, 2 и 4 МПК концентрации КВМЭЗ или антибиотика, затем инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Аликвоты культур со второй по величине концентрацией КВМЭЗ (0,25 МПК) или антибиотика, который обеспечивал рост ($ОП_{600} > 0,1$), разводили 1:100 в свежей среде ЛБ, которая содержала тот же набор концентраций МПК, что и на основе самых последних наблюдаемых МПК. При увеличении концентраций КВМЭЗ или антибиотика последовательное пассирование повторяли в течение 16 дней для каждого штамма, чтобы проверить стабильность устойчивых штаммов, штамм, который индуцирует устойчивость, равную или превышающую МПК, культивировали на планшетах с агаром ЛБ, затем одну колонию подвергали анализу на устойчивость в течение пяти дней.

2.9. Анализ биопленки *K. pneumoniae*

2.9.1. Образование биопленки

Образование биопленки анализировали на 96-луночных полистирольных планшетах с использованием метода Кристально-фиолетовый. Штаммы *K. pneumoniae* выращивали на бульоне ЛБ и инкубировали в течение ночи при 37 °С. Бактериальные культуры доводили до ОП₆₀₀ ~ 0,1, затем культуры оставляли расти без встряхивания в течение 24 ч при 37 °С, затем планктонные клетки удаляли и тщательно промывали ФБР (рН 7,2±0,2), не нарушая возможного образования биопленки вдоль стенки или прикрепления на дне, затем сушили при 37 °С в течение 40 минут. После этого в каждую лунку добавляли 125 мкл кристаллического фиолетового (1,5%) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Пластину промывали 3 раза d.H₂O для удаления пятна, затем высушивали при 60 °С в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 125 мкл уксусной кислоты (30%), затем инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин при встряхивании при 400 об/мин. Поглощение измеряли при 550 нм. Образование биопленки (ОБ) определяли по формуле: $ОБ = ПБ - ОС$, где ПБ это ОП₅₇₀ лунок с прикрепленными бактериями, а ОС — это ОП₅₇₀ окрашенных контрольных лунок (без бактериальных клеток). Образование биопленки каждым штаммом оценивалась как сильное (ОБ ≥ 0,300), умеренное (ОБ = 0,200-0,299), слабое (ОБ = 0,100-0,199) или отрицательное (ОБ < 0,100).

2.9.2. Анализ автоагрегации

Анализ аутоагрегации включал слипание клеток и осаждение, когда все штаммы *K. pneumoniae* выращивали в течение ночи в бульоне ЛБ при 37 °С при скорости перемешивания 200 об/мин. После центрифугирования при 3000 ×g в течение 7 мин бактериальные гранулы ресуспендировали в ФБРФБР (рН 7,4) для получения ОП₆₀₀ ~ 0,5 (один начальный). Затем клетки обрабатывали суб-МПК (0,125 мг/мл) КВМЭЗ, затем обработанные и необработанные (контрольные) бактерии инкубировали в течение 6 ч при 37 °С в статических условиях, и концентрацию каждой бактериальной суспензии измеряли при ОП₆₀₀ (ОП_{конечный}). Автоагрегация (%) была рассчитана с использованием следующего уравнения: Автоагрегация (%) = $(1 - \frac{ОП_{конечный}}{ОП_{начальный}}) \times 100$.

2.9.3. Анализы вязкости, нитевидности и осаждения

Вязкость слизистой оболочки штаммов *K. pneumoniae* определяли путем проведения седиментационного анализа. Вкратце, культуру, выращенную в течение ночи в бульоне ЛБ, разбавляли при ОП₆₀₀ до 0,1 в среде, затем выращивали при 37 °С с добавлением или без

добавления суб-МПК (0,125 мг/мл) КВМЭЗ. После этого культуру инкубировали в течение ночи, затем центрифугировали в течение 5 мин при $1000 \times g$. Супернатант удаляли, не нарушая осадка, для измерения ОП₆₀₀, выдерживали на 15 минут, затем визуально проверяли на наличие или отсутствие мукоидности в супернатанте и в осадке. Гипермукоидный фенотип = изолятов *K. pneumoniae* был подтвержден нитевидным тестом. Вкратце, бактериальные штаммы выращивали на планшете при 37 °С в течение ночи, и образование слизисто-вязкой нити размером > 5 мм на петле для бактериологической инокуляции определяли, как положительный нитевидный тест.

2.9.4. Испытание на гидрофобность

Тест на микробную адгезию к органическим растворителям был проведен для оценки гидрофильной/гидрофобной природы поверхности бактериальных клеток. Гидрофобность клеточной поверхности штаммов *K. pneumoniae*, образующих биопленку, определяли в присутствии КВМЭЗ. Клетки обрабатывали субингибирующей концентрацией КВМЭЗ (125 мкг/мл) в течение 4 ч при 37 °С, необработанные клетки использовали в качестве контроля. Клетки центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин, а полученные гранулы дважды промывали и повторно суспендировали в ФБР (рН 7,4) до 0,5 при ОП_{начальный}. К каждой суспензии (3,0 мл) добавляли 1,0 мл каждого растворителя отдельно (гексан, этилацетат, хлороформ, толуол), затем перемешивали в течение 2 мин и инкубировали при комнатной температуре. После 30 мин инкубации измеряли ОП водного слоя при 600 нм (ОП_{обработка}) и рассчитывали гидрофобность (%) обработанных и необработанных образцов, используя следующее уравнение: Гидрофобность (%) = $(1 - \text{ОП}_{\text{обработка}} / \text{ОП}_{\text{начальный}}) \times 100$.

2.10. Проверка факторов вирулентности бактерий с помощью анализов на подвижность

2.10.1. Роевая подвижность

Штаммы *K. pneumoniae* выращивали на агаре ЛБ с добавлением или без добавления КВМЭЗ в течение 24 ч при 30 °С. Затем чашки с роевым агаром, содержащим 1% глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 0,5% пептона (Sigma-Aldrich, США), 0,2% дрожжевого экстракта (Oxoid, Великобритания) и 0,5% агара (Sigma-Aldrich, США), уравнивали при комнатной температуре и инокулировали в центр с 10 мкл каждого штамма суспензии *K. pneumoniae*, содержащей 10^8 КОЕ/мл, в присутствии и в отсутствие (контроль) субмикронного ($\frac{1}{2}$ МПК) КВМЭЗ. Планшеты инкубировали без переворачивания в течение 24 ч при 30 °С, затем измеряли роевую подвижность как размер в мм миграции бактериальных клеток от точки инъекции к краям агаровой пластины на поверхности.

2.10.2. Плавательная подвижность

Штаммы *K. pneumoniae* высевали на агар ЛБ (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Затем по одной колонии каждого изолята инокулировали в присутствии или отсутствии (контроль) ½ МПК КВМЭЗ на поверхности чашек с плавающим агаром, содержащих 1,0% триптона (Oxoid, Великобритания), 0,5% хлорида натрия (Sigma-Aldrich, США) и 0,3% агара (Difco, США), предварительно выдержанных при комнатной температуре. Чашки инкубировали без переворачивания в течение 24 ч при 30 °С. Затем измеряли плавательную подвижность как размер в мм миграции бактериальных клеток от точки инъекции к краям агаровой пластины на поверхности.

2.10.3. Подергивающаяся подвижность

Штаммы бактерий *K. pneumoniae* высевали на агар ЛБ (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Затем по одной колонии каждого изолята инокулировали в присутствии или отсутствии (контроль) ½ МПК КВМЭЗ на дно чашек с подергивающимся агаром, содержащих 1,0% триптона (Oxoid, Великобритания), 0,5% дрожжевого экстракта (Oxoid, Великобритания), 1,0% хлорида натрия (Sigma-Aldrich, США) и 1,0% агара (Difco, США). Планшеты переворачивали и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Затем агар осторожно удаляли, и зону подвижности измеряли с точностью до миллиметра после окрашивания 2% кристаллическим фиолетовым (Sigma-Aldrich, США) в течение 2 ч. В качестве отрицательного контроля каждый штамм инокулировали в триптоновый соевый агар (Difco, США) в тех же условиях, затем измеряли подергивающую подвижность как размер в мм миграции бактериальных клеток от места инъекции к краям агаровой пластины под агаровым фильтром.

2.11. Ингибирование образования биопленки с помощью КВМЭЗ

Анализ ингибирования образования биопленки оценивали с помощью анализа кристаллического фиолетового в 96-луночном планшете для микротитрации. Штаммы *K. pneumoniae* культивировали в течение ночи при 37 °С, затем собирали, трижды промывали ФБРФБР (рН 7,4) и доводили до суспензии 10⁶ КОЕ/мл. 100 мкл КВМЭЗ разбавляли 2-кратным разведением в бульоне ЛБ для получения конечных четырех концентраций (1, 0,5, 0,25, 0,125 мг/мл) в 96-луночном планшете. Для отрицательного контроля в 96-луночный планшет в трех экземплярах добавляли 200 мкл бульона ЛБ. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл бактериальной суспензии, кроме отрицательного контроля, затем инкубировали при 37 °С в

течение 24 ч без встряхивания. Определяли минимальную концентрацию ингибирования биопленки (МКИБ) и минимальную концентрацию уничтожения биопленки (МКУБ) образовавшихся биопленок, при этом МКИБ был идентифицирован как самая низкая концентрация КВМЭЗ или антибиотика (Док), при которых не происходит роста. МКУБ определяли путем переноса аликвот (30 мкл) соскобленных биопленок на чашку с агаром LB, и она была идентифицирована как самая низкая концентрация КВМЭЗ или антибиотика (Док), которые предотвращают рост бактерий.

С другой стороны, после инкубации в течение 24 ч планктонные клетки удаляли путем трехкратной промывки ФБР (рН 7,2) с последующей сушкой при 37 °С в течение 40 мин. После этого в каждую лунку добавляли 125 мкл кристаллического фиолетового (1,5%) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Пластины промывали 3 раза d.H₂O для удаления излишков пятна, затем высушивали при 60 °С в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли 125 мкл уксусной кислоты (30%), затем инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин при скорости перемешивания 400 об/мин. Поглощение измеряли при 550 нм. Процент ингибирования биопленки рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ ингибирования биопленки} = \left[\frac{\text{ОП}_{\text{контроль}} - \text{ОП}_{\text{обработанный}}}{\text{ОП}_{\text{контроль}}} \right] \times 100.$$

2.12. Ингибирование зрелых биопленок, образованных штаммами *K. pneumoniae*, с присутствии КВМЭЗ

Анализ разрушения биопленки проводили на 96-луночном полистирольном планшете (TPP, Швейцария). Бактерии выращивали в планшетах в течение 48 ч при 37 °С для образования зрелых биопленок в лунках планшета для микротитрования. Затем среду осторожно удаляли, и планшет промывали с использованием буфера ФБР (рН 7,2) для удаления неплотно прилипших клеток. Свежеприготовленную среду и бульон добавляли в лунки планшета вместе с КВМЭЗ для получения конечных концентраций 0,25, 0,500, 1,0, 2,0 мг/мл. Полистирольный планшет инкубировали в течение следующих 24 ч в статических условиях. МКИБ и МКУБ были определены тем же методом (2.10.6). После инкубации в течение 48 ч лунки микропланшета промывали стерильным ФБР для удаления планктонных клеток с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым (0,1% раствор в воде) в течение 30 мин. Пятно удаляли, и планшет осторожно промывали d.H₂O, сушили при 60 °С в течение 60 мин, а биопленки растворяли 30%-ной уксусной кислотой. Поглощение регистрировали с помощью считывателя микропланшетов CLARIOstar и рассчитывали процент разрушения по отношению к контрольной группе.

2.13. Ингибирование смешанных биопленок, образованных штаммами *K. pneumoniae*, присутствии КВМЭЗ

Разрушение смешанной биопленки анализировали и количественно определяли в полистирольной 96-луночном планшете (ТРР, Швейцария). КВМЭЗ последовательно разводили 2-кратными разведениями на 96-микролуночном планшете для получения конечных концентраций в диапазоне 0,08-1,0 мг/мл. Все три штамма *K. pneumoniae* КРi1627, *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* АТСС ВАА-2473 выращивали на бульонной среде ЛБ, собирали, дважды промывали ФБР, и каждый штамм доводили до 10^6 КОЕ/мл. Смешанную бактериальную культуру формировали из равного объема 1,0 мл каждого штамма в отношении 1:1:1. 0,1 мл смешанных бактерий с суспензией 10^6 КОЕ/мл вводили в каждую лунку 96-микропланшета. Отрицательным контролем был только бульон ЛБ, полоа жительным контролем была смешанная биопленка без обработки. Планшет заклеивали пленкой герметизировали, чтобы предотвратить испарение, с последующей инкубацией при 37 °С в течение 24 ч. Планктонные клетки в смешанной биопленке удаляли во время осторожной промывки ФБР, высушивали, окрашивали 125 мкл 0,1% раствора кристаллического фиолетового (КФ) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Избыток окрашивания пятна удаляли и промывали d.H₂O, высушивали и, наконец, добавляли 125 мкл 30%-ной уксусной кислоты в каждую лунку для растворения смешанной биопленки, которую затем измеряли при 570 нм. Процент ингибирования смешанной биопленки рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ уменьшения смешанной биопленки} = \left[\frac{\text{ОП}_{\text{контроль}} - \text{ОП}_{\text{обработанный}}}{\text{ОП}_{\text{контроль}}} \right] \times 100$$

2.14. Разрушение мембраны *K. pneumoniae* с помощью КВМЭЗ

2.14.1. Относительная электропроводность

Значение относительной электропроводности (ЗОЭ) рассчитывали на основе измерений электропроводности и использовали в качестве меры проницаемости мембран бактерий. *K. pneumoniae* АТСС ВАА-2473 культивировали в 10 мл бульона ЛБ при 37 °С в течение 10 часов при встряхивании, затем центрифугировали при 4200 об/мин в течение 10 мин. Затем бактериальную гранулу промывали 5% глюкозой в воде до тех пор, пока ее значение ЗОЭ не стало равным или близким к значению ЗОЭ промывочного буфера (5% глюкозы), образуя так называемый изотонический раствор бактерий. Затем КВМЭЗ в четырех различных концентрациях (0,5 МПК, МПК, 2 МПК и 4 МПК) разводили в 5% глюкозе, а электропроводность смесей измеряли с помощью кондуктометра (Ionomer, Москва, Россия) и обозначали как Л₁. Затем те же концентрации КВМЭЗ добавляли в изотоническую суспензию *K. pneumoniae* АТСС

ВВА-2473 при 10^8 КОЕ/мл. После интенсивного перемешивания образцы инкубировали при 37 °С в течение восьми часов, измеряли электропроводность и помечали как L_2 . Бактерии в 5% глюкозе кипятили на водяной бане в течение 5 мин и использовали в качестве положительного контроля, используя их проводимость, обозначенную как L_0 . Относительную электропроводность рассчитывали по формуле (%) = $(L_2 - P_1)/L_0 \times 100$, отражающей значение проницаемости мембраны бактерий.

2.14.2. Анализ поглощения кристаллического фиолетового

Изменение проницаемости мембраны определяли с помощью анализа кристаллического фиолетового. Влияние КВМЭЗ на проницаемость мембран всех штаммов *K. pneumoniae* определяли с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. После инкубации в среде ЛБ при 37 °С в течение ночи штаммы *K. pneumoniae* собирали и трижды промывали ФБР (рН 7,4). Гранулы ресуспендировали в ФБР и смешивали с КВМЭЗ в концентрации от ¼ МПК до 2МПК в течение 4 ч. Бактериальные клетки инкубировали с 1% кристаллическим фиолетовым в темноте в течение 15 мин. После центрифугирования поглощение супернатанта определяли путем измерения ОП₅₉₀ нм с помощью считывателя микропланшетов CLARIOstar (BMG, Германия). Абсорбция кристаллического фиолетового принималась за 100%. Поглощение кристаллического фиолетового рассчитывали по следующей формуле: % поглощения = $(ОП_{образца}) / (ОП_{кристалльно-фиолетовый}) \times 100$.

2.14.3. Поглощение бромистого этидия

Штаммы *K. pneumoniae* собирали и трижды промывали ФБР (рН 7,4). Осадок повторно суспендировали в ФБР и смешивали с КВМЭЗ в концентрации от ¼ МПК до 2 МПК в течение 4 ч. Затем бактериальные клетки инкубировали с бромистым этидием (5 мкг/мл) в темноте в течение 15 мин. После центрифугирования 96-микропланшета супернатант анализировали с использованием возбуждения при 530 нм и детектирования длин волн при 585 нм. Контрольный образец (содержащий EtBr, но без бактерий) позволил нормализовать данные и представляет максимальную интенсивность флуоресценции с помощью считывателя микропланшетов CLARIOstar (BMG, Германия).

2.15. Разрушение биопленки с помощью КВМЭЗ, визуализированное с помощью методов микроскопии

2.15.1. Световая микроскопия

Способность экстракта КВМЭЗ из жира личинок *H. illucens* ингибировать образование биопленки была подтверждена методами микроскопии. Вкратце, биопленку штамма *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 выращивали на предметных стеклах (1 см²) (Thermo scientific, США), помещенных в 6-луночные полистирольные планшеты (ТРР, Швейцария). В частности, аликвоты 1,0 мл бактериальной культуры доводили до ОП₆₀₀ ~ 0,2, затем ее распределяли по покровному стеклу, инкубировали в течение 6 часов в статических условиях при 37 °С. После этого лунки заполняли различными концентрациями КВМЭЗ (0, 125, 250, 500 мкг/мл), достигая конечного объема 2 мл в каждой лунке, перед аэробной инкубацией при 37 °С в течение 24 ч без встряхивания. В качестве отрицательного контроля использовали бактериальные культуры без обработки. После инкубации надосадочную жидкость удаляли, пластины трижды промывали ФБР для удаления планктонных клеток, фиксировали 90%-ным этанолом в течение 15 мин и полностью высушивали при 30 °С. Затем биопленки окрашивали 1% кристаллическим фиолетовым в течение 20 мин при комнатной температуре. Излишки красителя промывали дистиллированной водой. Наконец, высушенные прокрашенные покровные стекла помещали на предметные стекла и анализировали при 40-кратном увеличении с использованием световой микроскопии (Nikon, модель: ECLIPSE TS 100, Токуо Воеки, Япония).

2.15.2. Флуоресцентная микроскопия

Архитектуру биопленки в отсутствие и в присутствии экстракта КВМЭЗ изучали с помощью флуоресцентной микроскопии. Штамм *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 выращивали на предметных стеклах (1 см²) (Thermo scientific, США), помещенных в 6-луночные полистирольные планшеты. В частности, аликвоты по 1,0 мл стартовой бактериальной культуры с бактериальной суспензией (ОП₆₀₀ ~0,4) распределяли на покровном стекле, затем лунки заполняли различными концентрациями КВМЭЗ (0, 125, 250, 500 мкг/мл), достигая конечного объема 2 мл в каждой лунке, затем инкубировали аэробно при 37 °С в течение 24 ч в статических условиях. Для отрицательного контроля бактериальную культуру без обработки КВМЭЗ подвергали тем же условиям инкубации. После 24 ч инкубации надосадочную жидкость удаляли, планшет трижды промывали ФБР, фиксировали 90%-ным этанолом в течение 15 мин и полностью высушивали при 30 °С. На следующем этапе биопленки окрашивали 1 мМ йодистым пропидием (англ. PI) в течение 15 мин при комнатной температуре. Избыток красителя смывали дистиллированной водой. Наконец, биопленки наблюдали с помощью флуоресцентного

микроскопа (Life Technologies, Ботелл, Вашингтон, США), оснащенного цифровой камерой. Цифровые изображения были получены с помощью 40-кратного объектива. РІ (длина волны возбуждения 543 нм; длина волны излучения 617 нм) испускает красную флуоресценцию. Все полученные изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения Fiji ImageJ (Национальные институты здоровья, Бетесда, США) для получения средней интенсивности флуоресценции биопленок.

2.15.3. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Обработанную и необработанную с КВМЭЗ биопленку штамма *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Клетки *K. pneumoniae* культивировали и выращивали на покровном стекле площадью 1 см² (Thermo scientific, США) в 6-луночном планшете (TPP, Швейцария) в течение 6 ч. Затем различные концентрации (0,0, 0,125, 0,250, 0,500 мг/мл) КВМЭЗ добавляли к сформированной биопленке в 96-луночном планшете, затем инкубировали в течение 24 ч при 37 °С без встряхивания, далее планктонные клетки удаляли путем трехкратной промывки ФБР (рН 7,4). Все прилипшие биопленки на поверхности покровных стекол фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом (рН 7,2) в течение ночи при 4 °С, трижды промывали промывочным буфером ФБР при 4 °С в течение 15 мин и обезвоживали биопленки в серии растворов этанола (30%, 50%, 70%, 80%, 90% и 95%). Все обезвоженные покровные стекла были визуализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии (TESCAN, Кохутовице, Чешская Республика).

2.16. Газовая хроматография-масс спектрометрия (ГХ-МС) анализа КВМЭ

ГХ-МС анализ проводили с использованием ультрамасс-спектрометра ГХ-МС -QP2010 (Shimadzu, Canby, OR, США) и автосамплера PAL 5000 (Gerstel, Zwingen, Швейцария). Разделение биологически активных соединений проводили с использованием капиллярной колонки DB-5ms (30 м × 0,25 мм × 0,25 мм), покрытой неполярным полимером силфенилена, полярность которого практически эквивалентна 5% дифенилу и 95% диметилполисилоксановой стационарной фазе (Restek, Bellefonte, Пенсильвания, США). Условия эксплуатации были следующими: температура инжектора и детектора была установлена на уровне 280 °С и 250 °С, соответственно. 1 мкл смеси вводили автоматически в режиме без разделения, кроме того, анализировали также отдельно. Температурная программа была следующей: начальная температура 40 °С поддерживалась в течение 1 мин, а затем ее увеличивали при 15 °С/мин до 210 °С, выдерживали в течение 0 мин, увеличивали при 5 °С/мин до 216 °С, выдерживали в течение 0 мин, увеличивали при 40 °С/мин до 300 °С и, наконец, выдерживают в течение 14,87 мин. В

качестве газа-носителя использовали гелий с линейной скоростью потока в колонне от 1 до 15 мл/мин, а давление в колонне составляло 50,4 кПа. Содержание жирных кислот в КВМЭ определяли с помощью масс-спектрометра (МС). МС работал в режиме электронной ионизации, и масс-спектры собирались в пределах от 33 до 1000 m/z . Качественный анализ соединений основан на сравнении их спектральной массы с данными базы данных масс-спектров NIST (NIST 08, 2008). Был присвоен индекс подобия пиков хроматограммы соединений, превышающий 70% в библиотеке NIST.

2.17. Механизм антибактериального действия КВМЭЗ в отношении штаммов МЛГУ *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606

2.17.1. Морфологические изменения бактерий, визуализированные с помощью СЭМ-микроскопии после обработки КВМЭЗ

Анализ при сканирующей электронной микроскопии, выполненный с использованием единственной колонии *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, которые культивировали в 5 мл бульона ЛБ и инкубировали при 37 °С при перемешивании при 180 об/мин в течение ночи. Бактериальные культуры центрифугировали при 4000 $\times g$ в течение 10 мин, а затем бактериальные осадки 4 раза промывали ФБР (10 мм, рН 7,2) при 4 °С и центрифугировали при 4000 $\times g$ в течение 5 мин. Бактериальные культуры *A. baumannii* ATCC 19606 доводили до ОП₆₀₀ ~ 0,2 с помощью ФБР, а затем обрабатывали 0,5х, 1 и 2 МПК и инкубировали в течение 12 ч, 20 мин, 10 мин соответственно, в то время как *S. aureus* ATCC 55804 обрабатывали 1, 2 и 4 МПК КВМЭЗ и инкубировали в течение 12 ч, 20 мин, 10 мин, соответственно. Необработанные образцы (контрольные) готовили таким же образом. Все бактериальные культуры собирали в контрольных точках и центрифугировали при 5000 $\times g$ при 4 °С в течение 10 мин, затем все бактериальные осадки 3 раза промывали ФБР (10 мм, рН 7,2), а затем по 100 мкл каждой культуры наносили на предметное стекло (Thermo scientific, США), высушивали в стерильных условиях в шкафу в течение 20 мин. Затем бактериальные клетки фиксировали на ночь 500 мкл 2,5 % (об/об) глутарового альдегида при 4°С. Фиксированные образцы дважды промывали 10 мм ФБР с последующей дегидратацией в градиентных растворах этанола (50, 70, 90 и 95 %) в течение 10 мин. Наконец, образцы были проанализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии (TESCAN Co., Брно-Кохутович, Чешская Республика).

2.17.2. Изменение компартментов бактериальных клеток, визуализированное с помощью просвечивающей электронной микроскопии

Все образцы *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 были приготовлены в соответствии с предыдущим способом, описанным в 2.14.1, но к образцам в пробирках объемом 15 мл добавляли 0,5 мл 2,5% глутарового альдегида и инкубировали в течение ночи при 4 °С для фиксации. После инкубации в течение ночи бактериальные клетки фиксировали 2%-ным тетроксидом осмия в течение 70 минут после удаления 0,5 мл глутарового альдегида. Фиксированные образцы трижды промывали ФБР (рН 7,4) и обезвоживали в течение 15 мин. Затем образцы обезвоживали в течение 10 мин в обеих смесях (1:1, об/об) абсолютного этанола и абсолютного ацетона. Образцы переносили в смесь (1:1, об/об) абсолютного ацетона и эпоксидной смолы в течение 30 минут с последующей инкубацией 1,0 мл чистой эпоксидной смолы в течение ночи при постоянной температуре 4 °С. Наконец, бактериальные образцы были разделены с помощью ультрамикротом (JEOL Ltd, Акисима, Токио, Япония). Аликвоту по 5 мкл каждой культуры помещали на поверхность медной сетки с 300 ячейками (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин. После удаления избытка жидкости бактерии окрашивали в течение 30 дней 1%-ным уранилацетатом (Sigma-Aldrich, США). Окрашенные клетки анализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (JEOL Ltd, Акисима, Токио, Япония) при увеичении в 10 000 раз.

2.17.3. Изменения размеров бактериальных клеток, определяемые методом атомно-силовой микроскопии (АСМ)

Образцы *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 были приготовлены аналогично методу, описанному в разделе 2.14.1, с некоторыми изменениями. Все бактериальные культуры собирали на контрольных точках и центрифугировали при 5000 × g при 4 °С в течение 10 мин, затем все бактериальные осадки промывали 3 раза ФБР (10 мм, рН 7,2). После этого по 100 мкл каждой культуры наносили на предметное стекло (Thermo scientific, США), сушили в стерильных условиях в шкафу в течение 20 мин. Затем бактериальные клетки фиксировали на ночь 500 мкл 2,5 % (об/об) глутарового альдегида при 4 °С. Фиксированные образцы дважды промывали 10 мм ФБР с последующей дегидратацией в градиентных растворах этанола (50, 70, 90 и 95 %) в течение 10 мин. Топографию поверхности обработанных и необработанных (контрольных) бактерий визуализировали с помощью АСМ (NT-MDT, Москва, Россия). Высушенные на воздухе образцы использовали для АСМ-визуализации, где этот способ визуализации обычно выполняется для оценки изменений в морфологии бактерий, вызванных КВМЭЗ.

Использовались V-образные кантилеверы с заточенными оксидом наконечниками Si₃N₄ с пружинными константами. Наконечник из нитрида кремния облучали ультрафиолетом на воздухе в течение 15 минут для удаления любых органических загрязнений перед использованием. Радиус кривизны наконечников составляет менее 10 нм, а длина, ширина и толщина консолей составляют 183, 34 и 3,0 МПК соответственно, с частотой колебаний 144 кГц и постоянной силы 6,0 Н/м. АСМ, изображения и измерения силы были записаны в контактном режиме при комнатной температуре. Были отсканированы различные области, и изображения были проанализированы с помощью прикладного программного обеспечения Image Analysis P9 (IAP9) (NT-MDT со., Москва, Россия) для получения морфологических характеристик (длина, ширина, высота, шероховатость, среднеквадратичное значение поверхности-RMS, эксцесс-Ska, асимметрия-Ssk). В каждом образце (как контрольном, так и обработанном) в среднем 35-50 клеток были выбраны случайным образом из двух независимых экспериментов и были визуализированы для определения влияния обработки КВМЭЗ на морфологию поверхности клеток.

2.17.4. Тест на солеустойчивость

Влияние концентрации соли на жизнеспособность бактериальных клеток в присутствии или отсутствии (контроль) экстракта КВМЭЗ, последовательно выделенного из жира личинок *H. illucens*, проводили на 96-луночном планшете (TPP, Швейцария). Влияние солеустойчивости *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804, обработанных концентрациями КВМЭЗ МПК и 2 МПК, оценивали на планшетах с питательным агаром (NA), дополненных различными концентрациями NaCl. Свежие бактериальные культуры инкубировали при 37 °С в течение ночи. После инкубации ночные культуры *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804 обрабатывали КВМЭЗ, затем инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. Затем образцы последовательно разбавляли и инокулировали на NA-планшеты, добавляя различные концентрации NaCl (0 %, 2.5 %, 5 %, и 10%). (Пластины NA-NaCl) Бактериальную культуру без КВМЭЗ использовали в качестве контроля для каждой пластины NA-NaCl. Результаты были выражены в терминах Log₁₀ КОЕ/мл как среднее значение трех независимых экспериментов.

2.17.5. Тест на время убивания

Антимикробную активность КВМЭЗ с течением времени определяли в отношении *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606. В течение ночи культуры бактериальных клеток суспендировали в бульоне ЛБ и доводили до поглощения 10⁶ КОЕ/мл. Различные концентрации экстракта КВМЭЗ жира личинок *H. illucens* или положительного контроля (П/С) добавляли к

суспензиям инокулята с конечными концентрациями 0,5 МПК, 1 МПК, 2 МПК и 4 МПК и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч при встряхивании при 180 об/мин. Аликвоты удаляли из посевных культур через 0, 5, 10, 20 и 60 мин, а затем увеличивали инкубацию до 12 ч и 24 ч. После инкубации бактериальные культуры последовательно титровали, высевали на МН-агар и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. Подсчитывали жизнеспособные бактериальные клетки (КОЕ), степень и уровень уничтожения бактерий определяли методом построения графика \log КОЕ/мл в зависимости от времени, по крайней мере, в трех независимых экспериментах, затем анализировали с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Даннетта для определения значимости относительно необработанных бактерий ($P < 0,05$).

2.17.6. Анализ утечки цитоплазматического содержимого

Измерение высвобождения поглощающих материалов при длине волны 260 нм из *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 определяли путем измерения высвобождения цитоплазматического содержимого. Клетки из 5 мл бактериальной суспензии собирали центрифугированием при $5000 \times g$ в течение 10 мин, трижды промывали 0,1 М ФБР (рН 7,4) и ресуспендировали в ФБР (0,1 М, рН 7,4) до плотности бактерий 10^6 КОЕ/мл. 3,0 мл клеточных суспензий инкубировали при 37 °С при перемешивании в шейкере инкубатора для окружающей среды в течение 0 ч, 1 ч и 2 ч в присутствии и отсутствии (контроль) КВМЭЗ в двух концентрациях (МПК, 2 МПК). Затем суспензии центрифугировали при $4000 \times g$ в течение 5 мин. После этого измеряли поглощение при 260 нм, 280 нм супернатантов после фильтрации шприцевым фильтром 0,22 МПК (Sartorius, Kings Norton, Бирмингем, Великобритания) с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, DE, США). Результаты были представлены в терминах оптической плотности поглощающих материалов 260 нм и 280 нм. Средние значения ОП соответствующих обработок и контроля транспортного средства сравнивались независимо в каждый момент времени.

2.17.7. Тест Алмар синий

Анализ жизнеспособности клеток проводили на 96-луночном планшете с использованием набора реагентов для анализа жизнеспособности клеток Almar blue (англ. АВ) (Thermo Scientific, Лафборо, Великобритания). Эффективность КВМЭЗ, выделенного из жира личинок *H. illucens*, оценивали с использованием набора АВ. Для анализа 100 мкл КВМЭЗ последовательно разводили в 2-кратных разведениях в среде бульона МН для получения конечных концентраций (1,5, 0,75, 0,38, 0,19, 0,095, 0,048, 0,024, и 0,012 мг/мл). Затем 100 мкл бактерий с плотностью 10^6

КОЕ/мл *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 добавляли в планшет, а затем планшет закрывали, чтобы избежать испарения, и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. Аналогичным образом, положительный контроль (П/С) оценивали в диапазоне концентраций (0,6-78,125 мкг/мл) против *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 с последующей инкубацией при тех же условиях после посева бактериальных культур в 96-луночный планшет. После этого в каждую лунку добавляли по 20 мкл АВ. Удельную активность АВ определяли после 4 ч инкубации при 37 °С при встряхивании со скоростью 160 об/мин. Наконец, измерьте флуоресценцию АВ при возбуждении 540-570 нм и излучении при 585-615 нм. Данные, выраженные в процентах жизнеспособности, по сравнению с необработанными клетками. Кроме того, заготовка, включенная во время инкубации АВ, представляла собой лунки без клеток (только АВ). Жизнеспособность рассчитывали на основе сравнения с поглощением необработанных и обработанных клеток. Значения МПК50 были получены из концентрации КВМЭЗ жира личинок *H. illucens*, который индуцировал 50%-ное ингибирование роста клеток с использованием программного обеспечения Graph Pad prism 7.0.

2.17.8. Анализ внутриклеточного АТФ

Влияние КВМЭЗ на клеточные уровни АТФ в *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 определяли с использованием набора для анализа ViaLight MDA Plus (Lonza Rockland, Inc, США) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ проводили на 96-луночном U-образном непрозрачном белом планшете для микротитрования в трехповторах. *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 выращивали в бульоне МН при 37 °С в течение ночи, а клетки собирали центрифугированием, промывали и ресуспендировали в свежей среде. Затем в 96-луночный непрозрачный планшет добавляли 50 мкл бульона МН, а затем 50 мкл КВМЭЗ разводили в 2-кратных разведениях при различных концентрациях (0,75, 0,38, 0,19, 0,095 мг/мл). Аналогичным образом, положительный контроль (П/С) разводили в 2-кратных разведениях при тех же условиях в концентрациях (4,88-39 мкг/мл), после чего в каждую лунку добавляли по 50 мкл 10⁶ КОЕ/мл и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл бактолиз плюс, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин без встряхивания. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл АМР плюс и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин. В считыватель BMG CLARIOstar вставляли непрозрачную 96-луночный планшет (Thermo scientific, США), регистрировали люминесценцию АТФ. Сигналы представляют собой среднее значение трех повторов для каждого измерения.

2.17.9. Анализ поглощения йодида пропидия (ПЙ-поглощение)

Проницаемость мембраны считается важным доказательством разрушения или утечки клеточной мембраны из-за активности КВМЭЗ. Йодид пропидия (ПЙ) обычно используется в качестве ДНК-красителя, который может проникать в клетки с поврежденной клеточной мембраной, но не может проникать в клетки с неповрежденной клеточной мембраной. *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 выращивали на бульоне МХ в течение ночи при 37 °С при встряхивании 180 об/мин. Клетки трижды промывали буфером, содержащим 5 мм ФБР и 20 мм глюкозы, при рН 7,2, затем доводили до получения бактериальной суспензии с плотностью, эквивалентной 0,5 стандарта мутности Макфарланда, а затем инкубировали с 7,5 мкг/мл йодида пропидия (Sigma-Aldrich) при 37°С в течение 10 мин. После инкубации *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 обрабатывали различными концентрациями КВМЭЗ (0,095-0,76 мг/мл) в течение 10 ч, и интенсивность флуоресценции ПЙ-красителя контролировали каждые 5 мин с помощью считывателя микропланшетов CLARIOstar при длине волны возбуждения 543 нм и длине волны излучения 615 нм. Поглощение ПЙ (%) было рассчитано на основе нормализованных данных, которые представляют собой среднее значение \pm SD трех независимых экспериментов, один из способов, которым обычный тест множественных сравнений ANOVA Даннетта (*p <0,05) был значимым.

2.18. МТТ тест на цитотоксичность

МТТ тест проводили на 96-луночном планшете (РТТ, Швейцария). Для анализа 100 мкл КВМЭЗ последовательно разводили в 2-кратных разведениях в среде DMEM для получения конечных концентраций (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, и 7,813 мкг/мл), затем добавляли в 96-луночный планшет, который содержал 100 мкл клеток ЭПЧ-293, далее планшет инкубировали в течение 24 ч при 37 °С и 5% CO₂. После этого в каждую лунку добавляли 20 мкл 5 мг/мл МТТ (1×10^4 клетки/лунка). Специфическую активность МТТ определяли после 2 ч инкубации при 37 °С и 5% CO₂, затем в 96-луночный планшет добавляли 100 мкл ДМСО. Планшет встряхивали в течение 10 мин для растворения кристаллов формазана. Результаты представляли в процентах жизнеспособности клеток, по сравнению с необработанными клетками. Кроме того, для компенсации фона во время инкубации МТТ, использовали лунки без клеток (только ДМСО+МТТ). Жизнеспособность рассчитывали на основе сравнения с поглощением необработанных и обработанных клеток. Значения ПК₅₀ были получены из концентрации КВМЭЗ жира личинок *H. illucens*, который индуцировал 50%-ное ингибирование роста клеток с использованием программного обеспечения Graph Pad prism 7.0. Оптическую

плотность в каждой лунке определяли с помощью считывателя микропланшепросторах и повторялся три раза.

2.19. Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводились в трех повторах и повторялись три раза для обеспечения воспроизводимости. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием стандартного пакета Microsoft Office Excel путем вычисления стандартного отклонения (σ) и среднего значения стандартной ошибки (англ. SEM). Для анализа результатов были выполнены односторонний ANOVA, двусторонний ANOVA и нелинейная регрессионная модель с использованием программного обеспечения для статистического анализа Graphpad Prism 7.0 (Graphpad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Уровень значимости составил ($P < 0,05$).

Глава 3. Жир личинок *Hermetia illucens* подавляет и уничтожает фитопатогенные бактерии

3.1. Биологически активные соединения, экстрагированные из жира личинок *H. illucens*

Было предпринято несколько попыток выбрать наилучший растворитель для экстракции антимикробных соединений из жира личинок мухи Черная львица (ЛМЧЛ), поэтому мы протестировали растворимость жира ЛМЧЛ в 21 органическом растворителе по отдельности или в комбинации. Чтобы увеличить выход экстракта, мы отрегулировали концентрацию жира в диапазоне от 10% до 30% (по массе) для каждого растворителя при комнатной температуре. Жир растапливали под горячей водопроводной водой и тестировали на различных органических растворителях, разбавленных H₂O, которую использовали для повышения гидрофильности. Мы обнаружили, что жир растворим почти во всех неполярных реагентах, включая CCl₄, C₆H₁₄, CH₂Cl₂, CHCl₃, ДМФА и CH₃CN, а также в комбинации соединений (9:1, об/об), таких как C₆H₁₄ + C₃H₆O, C₆H₁₄ + CH₃CN, ДМСО + C₃H₆O, C₆H₁₄ + CH₃CN, C₆H₁₄ + CH₃CN, ДМСО + C₃H₆O, ДМСО + CH₃CN, CHCl₃ + CH₃CN, CHCl₃ + C₃H₆O, C₅H₁₁OH + C₃H₆O, C₅H₁₁OH + ДМСО (табл.1).

Таблица 1. Оценка растворимости жира ЛМЧЛ

Жир (%) Растворитель	10% Жир	10% Жир + H ₂ O	15% Жир	15% Жир +H ₂ O	20% Жир	20% Жир +H ₂ O	25% Жир	25% Жир +H ₂ O	30% Жир	30% Жир +H ₂ O
CCl ₄	+	±	+	±	+	±	+	---	+	---
C ₆ H ₁₄	+	+	+	+	+	±	+	---	±	---
CH ₂ Cl ₂	+	±	+	+	+	+	±	---	±	---
ДМСО	±	+	±	+	±	+	±	---	---	---
CHCl ₃	+	---	±	±	±	±	±	---	±	---
ДМФА	+	±	±	±	±	±	±	---	±	---
CH ₃ CN	+	±	±	±	±	±	±	---	±	---
CH ₃ OH	±	±	---	---	---	---	---	---	---	---
C ₅ H ₁₁ OH	+	±	+	±	+	±	+	---	+	---
C ₂ H ₅ OH	±	+	±	±	±	±	±	---	±	---
C ₃ H ₆ O	±	+	±	+	±	+	±	---	±	---
CHCl ₃ + ДМФА (9:1, об/об)	+	±	+	±	+	±	+	---	+	---
C ₆ H ₁₄ + C ₃ H ₆ O (9:1, об/об)	+	±	+	±	+	±	±	---	±	---
C ₆ H ₁₄ + CH ₃ CN (9:1, об/об)	+	±	+	±	+	±	±	---	±	---

ДМСО + C ₃ H ₆ O (9:1, об/об)	+	+	±	+	±	±	±	---	±	---
ДМСО + CH ₃ CN (9:1, об/об)	+	+	±	+	±	+	±	---	±	---
CHCl ₃ + CH ₃ CN (9:1, об/об)	+	±	+	±	+	±	±	---	±	---
CHCl ₃ + C ₃ H ₆ O (9:1, об/об)	+	+	±	±	±	±	±	---	±	---
C ₃ H ₁₁ OH + C ₃ H ₆ O (9:1, об/об)	+	±	+	±	±	±	±	---	±	---
C ₃ H ₁₁ OH + ДМСО (9:1, об/об)	±	±	±	±	±	±	---	---	---	---

- **Обозначение растворимости:** (+) растворимый; (±) частично растворимый; (---) нерастворимый

Однако мы наблюдали образование легкой фракции на верхней части двойных слоев при экстрагировании гидрофобными растворителями, такими как CHCl₃, ДМСО и C₆H₁₄. Мы заметили, что при растворении жира ЛМЧЛ в гидрофильных реагентах, CH₃CN, CH₃OH или C₁₅H₁₁OH, на дне органического растворителя образуется мутный слой. При увеличении концентрации жира с 10% до 30% (об/об) выявлено снижение растворимости жира практически для всех органических растворителей, за исключением тетрахлорметана, пентанола и смеси хлороформ-диметилформамид (9:1, об/об), как показано на рисунке S1.

Когда мы оценивали антимикробную эффективность растворимых или частично растворимых фракций жира ЛМЧЛ, полученных в результате анализа растворимости, все растворимые или частично растворимые фракции были протестированы против фитопатогенных бактерий, ни одна из них не продемонстрировала зон ингибирования вокруг диска диаметром 6 мм. Следовательно, новый разработанный экстракционный раствор содержит воду, метанол и соляную кислоту в соотношении (90: 9: 1 % (об/об)), используемый для извлечения активных молекул из жира ЛМЧЛ при комнатной температуре. Экстракционный раствор обозначен как раствор кислотного водного метанола (КВМ), в то время как экстракт жира ЛМЧЛ обозначен как кислотный водный метанольный экстракт (КВМЭ1). Кроме того, когда процедуру экстракции повторили три раза при тех же условиях, и три экстракта смешали вместе, то его обозначили как КВМЭ; затем была проверена антибактериальная активность смеси КВМЭ в отношении штаммов фитопатогенных бактерий. В этом исследовании мы впервые использовали жир личинок *H. illucens*, полученный путем прямого прессования живых личинок мух (15-дневного возраста). Экстракт с высоким выходом 4,43%, полученный при экстракции жира ЛМЧЛ, по сравнению с

0,52%, экстрагированным водой [242] и 2%, экстрагированным с использованием метанола [36]. Хотя жир личинок *H. illucens* демонстрирует значительную растворимость в отдельных или комбинированных неполярных органических растворителях, но не проявляет активности против фитопатогенных бактерий. С другой стороны, разработанный раствор для экстракции ЛМЧЛ способен извлекать биологически активные молекулы, которые были оценены в следующих экспериментах, демонстрируя высокую активность против тех же фитопатогенов.

3.2. Измерение диаметра зоны ингибирования с помощью дискового диффузионного анализа

Антибактериальный эффект КВМЭ из жира ЛМЧЛ против пяти важных фитопатогенов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 13951, *Pectobacterium atrosepticum* ATCC ВАА-672D, *Pantoea agglomerans*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* оценивали с помощью метода диффузии агарового диска. Репрезентативные результаты ингибирования роста фитопатогенных бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 13951 и *Pectobacterium atrosepticum* ATCC ВАА-672D в течение 12 ч и 24 ч обработки (Таблица 2, рисунок S2).

Таблица 2. Антибактериальная чувствительность экстракта КВМЭ к штаммам фитопатогенных бактерий

КВМЭ	Хсс		Pagg		Dsol		Pcc		Pba	
	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч
50	23,5 ± 0,35	19,0 ± 0,28	15,4 ± 0,28	12,5 ± 0,7	18,5 ± 0,7	14,0 ± 0,7	20,25 ± 1,76	14,75 ± 0,35	14,75 ± 0,75	12,2 ± 0,56
25	16,5 ± 0,42	12,5 ± 0,7	10,5 ± 0,7	8,5 ± 0,35	14,2 ± 0,28	11,0 ± 0,7	13,25 ± 0,35	10,12 ± 0,18	12,25 ± 0,35	9,5 ± 0,7
12.5	12,0 ± 0,35	8,0 ± 0,7	9,3 ± 0,21	7,0 ± 0,0	11,0 ± 0,7	9,0 ± 0,7	8,5 ± 0,35	7,0 ± 0,0	9,12 ± 0,18	7,12 ± 0,18
6.25	7,25 ± 0,28	НО	8,0 ± 0,7	НО	9,0 ± 0,7	7,0 ± 0,0	7,25 ± 0,35	НО	7,37 ± 0,18	НО
3.13	НО	НО	7,0 ± 0,0	НО	7,0 ± 0,0	НО	НО	НО	НО	НО
П/С	23,75 ± 0,35	24,0 ± 0,35	20,75 ± 0,35	21,0 ± 0,7	23,75 ± 0,7	23,75 ± 0,7	21,12 ± 0,18	21,0 ± 0,7	21,0 ± 0,7	20,63 ± 0,53
КВМ	7,0 ± 0,0	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО	НО

Обозначения: Хсс, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; Pagg, *Pantoea agglomerans*; Dsol, *Dickeya solani*; Pcc, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pba, *Pectobacterium atrosepticum*; НО, не обнаруживается; КВМЭ, кислотный водно-метанольный экстракт из жира ЛМЧЛ; Раствор для экстракции - КВМ.

КВМЭ эффективно подавлял рост бактерий для всех протестированных патогенных штаммов *Xcc*, *Pagg*, *Dsol*, *Rcc* и *Pba* (таблица 2). КВМЭ подавлял рост всех фитопатогенов дозозависимым образом в диапазоне от 50 до 3,13 мг/мл тестируемых концентраций (таблица 2). Таким образом, штаммы *Pagg* и *Dsol* были наиболее чувствительны в течение 12 ч инкубации к обработке КВМЭ при минимальной концентрации 3,13 мг/мл. В частности, для всех других штаммов тот же эффект наблюдался при концентрации КВМЭ 12,5 мг/мл. Восприимчивость бактерий к обработке КВМЭ уменьшилась после 24 ч роста бактерий, по сравнению с 12 ч, как показано на рисунке S2 и рисунке 7.

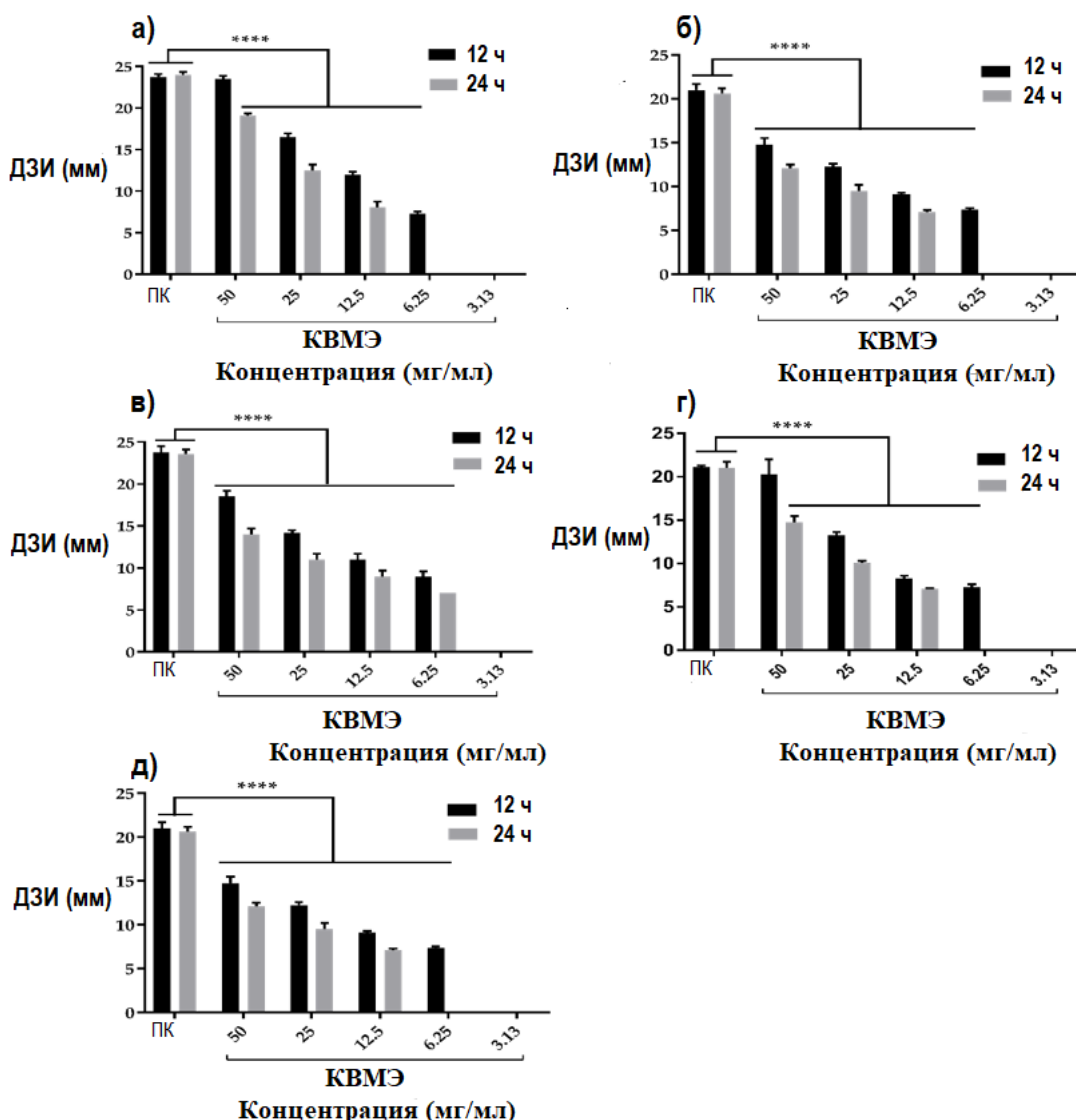


Рисунок 7. Диффузионный тест на агаровом диске, антимикробная эффективность КВМЭ против *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (а), *Pantoea agglomerans* (б), *Dickeya solani* (в), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* штаммы бактерий (г) и *Pectobacterium atrosepticum* (д). Бактерии подвергались воздействию 50, 25, 12,5, 6,25 и 3,13 мг/мл экстракта из жира ЛМЧЛ. Зона подавления роста бактерий, измеренная через 12 ч и 24 ч инкубации при $28 \pm 0,5$ °C по диаметру прозрачной зоны, окружающей диска (в мм). Пенициллин - стрептомицин (П/С) использовался в качестве антибактериального положительного контроля. Все значения

представлены как среднее значение \pm SD, в трех повторках (n=3). Данные были проанализированы с помощью двустороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные представлены как достоверная разница по сравнению с положительным контролем и ****P <0,0001.

Размер ДЗИ после 12 ч инкубации был самым высоким для штамма Xcc ($23,5 \pm 0,35$ мм) и самым низким для штамма Pba ($14,75 \pm 0,75$ мм) при концентрации КВМЭ 50 мг/мл, в то время как через 24 ч он уменьшился до $19,0 \pm 0,28$ мм и $12,2 \pm 0,56$ мм, соответственно. Снижение уровня КВМЭ в диапазоне от 50 мг/мл до 3,13 мг/мл привело к существенному уменьшению размера ДЗИ в течение 12 ч инкубации, по сравнению с 24 ч. Так, для наиболее восприимчивого штамма Xcc размер ДЗИ уменьшился на 69,1% с $23,5 \pm 0,35$ мм до $7,25 \pm 0,28$ мм после 12 ч инкубации, в то время как через 24 ч только на 57,0% с $19,0 \pm 0,28$ мм до $8,0 \pm 0,7$ мм. Небольшое колебание размера ДЗИ между $20,63 \pm 0,53$ - $24,0 \pm 0,35$ мм для положительного контроля пенициллина/стрептомицина при нагрузках от 5000 МЕ/мл до 5000 мкг/мл существенно не изменилось между 12 и 24 ч инкубации. Все ДЗИ, вызванные КВМЭ, сравнивались с размерами зон положительного контроля (П/С) после 12 ч, 24 ч инкубации (****P <0,0001), как показано на рисунок 7. Эти результаты показали, что химические соединения, извлеченные из жира личинок *H. illucens* с использованием экстракции кислой водой с метанолом, обладают эффективной антибактериальной активностью в отношении пяти патогенов растений. Следует отметить, что экстрагированные антимикробные пептиды (АМП) из ЛМЧЛ показали меньший размер ДЗИ (15,0 мм) [243] в анализе зонного ингибирования для Xcc в течение 24 ч, по сравнению с нашими результатами исследования антибактериальной активности КВМЭ. АМП продемонстрировали ингибирующий эффект против грамотрицательных бактерий при ДЗИ в диапазоне от 9 до 13 мм [242].

3.3. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) КВМЭ экстракта

МПК определяли на 96-луночном планшете методом турбидометрического анализа, и значение МПК составляло 0,78 мг/мл для всех протестированных фитопатогенов. Для сравнения, МПК для положительного контроля пенициллин-стрептомицин составил 3,13 Ед/мл-мкг/мл для всех штаммов, за исключением Xcc, который зарегистрировал 6,25 Ед/мл-мкг/мл (таблица 3).

Таблица 3. Антибактериальная активность КВМЭ, измеренная с помощью МПК и МБК, в отношении фитопатогенных бактерий

Антибактериальное средство КВМЭ	Активность	Концентрация (мкг/мл)				
		Xcc	Paag	Dsol	Pcc	Pba

	МПК	780	780	780	780	780
	МБК	780	1560	780	780	780
Положительный контроль (П/С)	МПК	6,25	3,13	3,13	3,13	3,13
	МБК	6,25	3,13	3,13	3,13	3,13

МБК, который убивает 99,9% бактерий, указывает на антимикробную активность КВМЭ, и она была определена на основе значения МПК. МБК КВМЭ составил 0,78 мг/мл для всех фитопатогенных штаммов, за исключением *Pagg*, который был менее восприимчив к КВМЭ с МБК 1,56 мг/мл. МБК положительного контроля (П/С) составил 6,25 Ед/мл–мкг/мл только для штамма *Xcc* и 3,125 Ед/мл–мкг/мл для всех остальных штаммов (таблица 3). Кроме того, реагент для экстракции ЛМЧЛ (реагент КВМ) дополнительно проверен в качестве отрицательного контроля на его антибактериальную способность в том же диапазоне концентраций, который использовался в турбидиметрическом анализе для КВМЭ. Мы обнаружили, что реагент КВМ не влияет на рпролиферацию всех протестированных бактерий. Эти результаты указывают на эффективность КВМЭ для подавления роста бактерий, особенно таких значимых патогенов, как *Pantoea agglomerans*, *Dickeya solani* и *Pectobacterium atrosepticum*. Наши результаты показали, что КВМЭ, по-видимому, более эффективен, чем АМП, кофеин и фитохимические вещества, против реальных фитопатогенов [243–245].

Все вышеупомянутые результаты доказывают высокую бактерицидную эффективность КВМЭ ко всем протестированным фитопатогенам. Следует отметить, что, хотя МПК экстракта личинок в наших экспериментах (0,78 мг/мл/лунка) были выше, чем МПК стандартного антибиотика (3,13 Ед/мл–6,25 мкг/мл/лунка), антибиотик П/С состоял из очищенных активных ингредиентов, по сравнению с сырыми экстрактами личинки мух [246]. Хотя МПК для D-метилового эфира молочной кислоты, экстрагированного из алоэ вера, равнялся 93,75 мкг/мл против *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* (*Xcc*), но МБК составлял 1,5 мг/мл и, кроме того, он не был эффективен против *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*), по сравнению с нашими результатами [247]. Soberón *et al.* [248] заявили, что метанол и водный экстракт листьев *Ligaria cuneifolia* и *Jodina rhombifolia* имеют МПК в диапазоне от 2,5 до 156 мкг/мл и 5 мг/мл, соответственно, против *Xcc*, в то время как эти экстракты были бактериостатическими. Эти результаты демонстрируют, что КВМЭ из жира ЛМЧЛ характеризуется бактерицидными соединениями, которые способны ингибировать и уничтожать все пять фитопатогенных бактерий при низких концентрационных дозах.

3.4. Значения концентрации КВМЭ для 50%-ного подавляющая (МПК50), эффективной против патогенных бактерий растений

Эффективность в виде значений 50% ингибирующей концентрации (МПК50) КВМЭ против роста патогенных видов *Xcc*, *Pagc*, *Dsol*, *Pcc* и *Pba* определяли через 6 ч (ранний), 12 ч (средний) и 24 ч (поздний) после заражения на основе зависимости доза-реакция данные кривой из нашего предыдущего турбидиметрического анализа (таблица 4, рисунок 8).

Таблица 4. Анализ МПК50 для фитопатогенов, обработанных КВМЭ из жира, по сравнению с положительным контролем (пенициллин/стрептомицин) в течение 6 ч, 12 ч и 24 ч

Бактерия вид	МПК50 (мкг/мл) КВМЭ против обработанных бактерий			МПК50 (мкг/мл) положительного контроля против обработанных бактерий		
	6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч
<i>Xcc</i>	535,1 ± 0,16	477 ± 0,25	485,4 ± 0,4	1,941 ± 0,15	1,844 ± 0,26	1,893 ± 0,36
<i>Pagc</i>	299,5 ± 0,12	383,6 ± 0,22	366,8 ± 0,38	1,103 ± 0,13	1,638 ± 0,22	1,283 ± 0,37
<i>Dsol</i>	451,8 ± 0,07	455,1 ± 0,2	441,8 ± 0,36	1,060 ± 0,1	1,675 ± 0,19	1,306 ± 0,35
<i>Pcc</i>	317,6 ± 0,07	386,6 ± 0,22	431 ± 0,35	1,099 ± 0,13	1,782 ± 0,19	1,412 ± 0,35
<i>Pba</i>	290,3 ± 0,07	376,1 ± 0,22	400,2 ± 0,35	1,088 ± 0,07	1,630 ± 0,22	1,326 ± 0,35

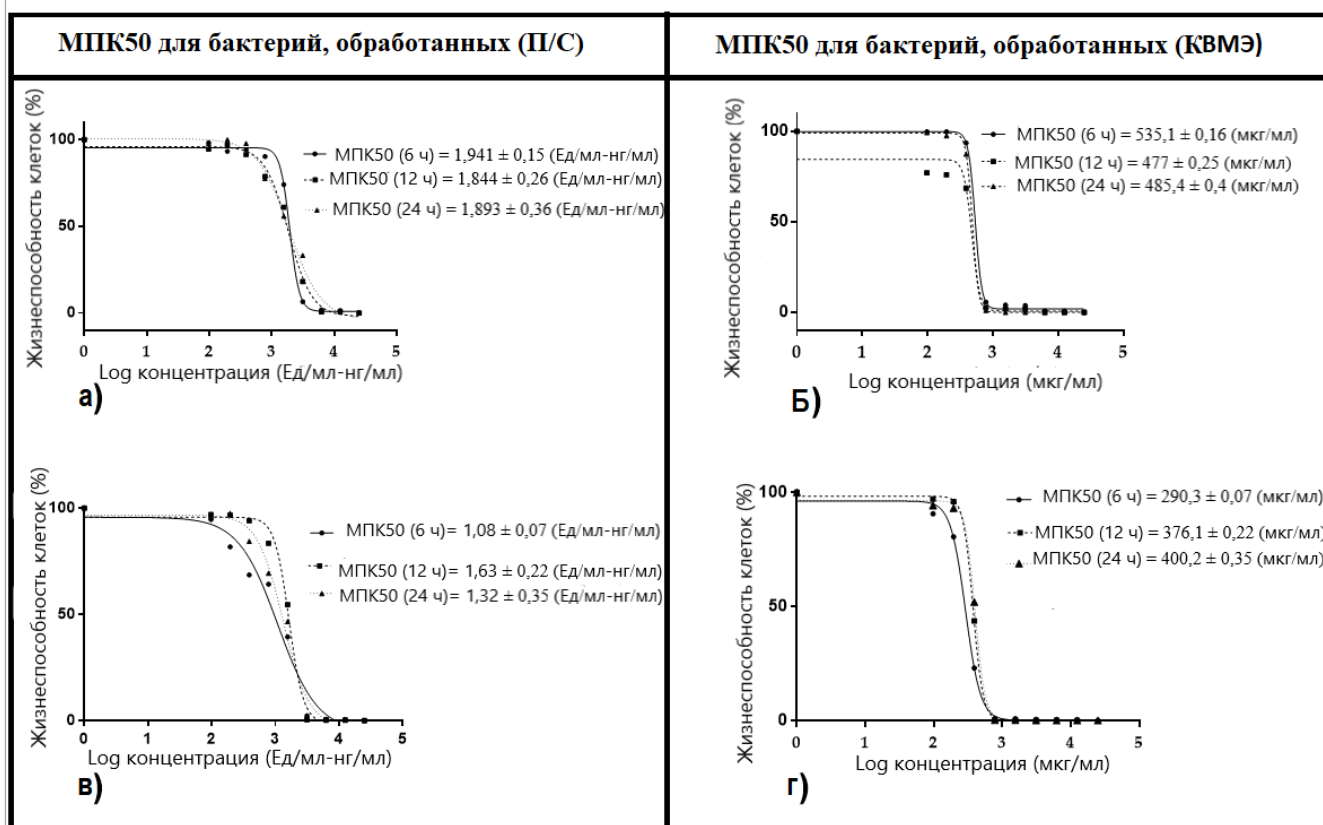


Рисунок 8. МПК50 патогенных бактерий растений, обработанных КВМЭ из жира личинок, определяли по данным турбидиметрического анализа и сравнивали с результатами положительного контроля пенициллин-стрептомицин (П/С) в том же эксперименте. Жизнеспособность фитопатогенных клеток через 6 ч, 12 ч и 24 ч для а) *X. campestris* pv *campestris*, обработанного (П/С), б) *X. campestris* pv. *campestris*, обработанного КВМЭ, в) *Pectobacterium atrosepticum*, обработанного (П/С), г) *Pectobacterium atrosepticum*, обработанного КВМЭ. Значения МПК50 рассчитаны с использованием нелинейной регрессионной модели программного обеспечения Graphpad Prism 7. Представленные значения представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения. Значения МПК50, выраженные для бактерий, обработанных КВМЭ, в диапазоне (0-25000 мкг/мл) и для положительного контроля (П/С) в диапазоне (0-25 Ед/мл- мкг/мл). Каждое значение МПК50 на кривой представляло собой среднее значение трех независимых экспериментов \pm среднее значение ошибки стандартного отклонения (SEM).

Значения МПК50 указывали на самую высокую устойчивость штамма *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* к обработкам КВМЭ и стандартным положительным контролем П/С уже через 6 ч после заражения ($535,1 \pm 0,16$ мкг/мл и $1,941 \pm 0,15$ мкг/мл соответственно). Интересно, что эти значения МПК50 КВМЭ и П/С для этого штамма оставались самыми высокими до 24 ч после заражения, по сравнению со всеми тестируемыми штаммами ($485,4 \pm 0,4$ мкг/мл и $1,893 \pm 0,36$ Ед/мл–мкг/мл, соответственно). С другой стороны, КВМЭ показал самую высокую активность через 6 ч и сохранял самую высокую в течение 24 ч мониторинга в отношении штаммов Pba и Pagg со значениями МПК50, равными 290.3 ± 0.07 против 400.2 ± 0.35 и 299.5 ± 0.12 против 366.8 ± 0.38 мкг/мл, соответственно, как показано на рисунке 8. Кроме того, КВМЭ продемонстрировал высокую стабильность и способность поддерживать постоянную чувствительность в течение 24 ч обработки штамма *Dickeya solani*, о чем свидетельствуют аналогичные значения МПК50 ($451,8 \pm 0,1$, $455,1 \pm 0,2$ и $441,8 \pm 0,36$ мкг/мл через 6 ч, 12 ч, 24 ч, соответственно). Напротив, все зарегистрированные значения МПК50 стандартного положительного контроля колебались для всех тестируемых штаммах. Эти результаты позволяют заключить, что разработанный КВМЭ из жира ЛМЧЛ может предотвращать и устойчиво ингибировать размножение и рост патогенов растений уже через 6 ч инкубации, что позволяет использовать его в качестве антибактериального средства против фитопатогенных бактерий, по сравнению с другими экстрактами [242,249].

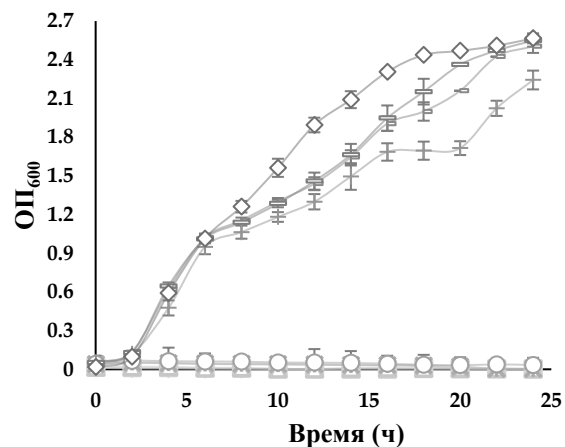
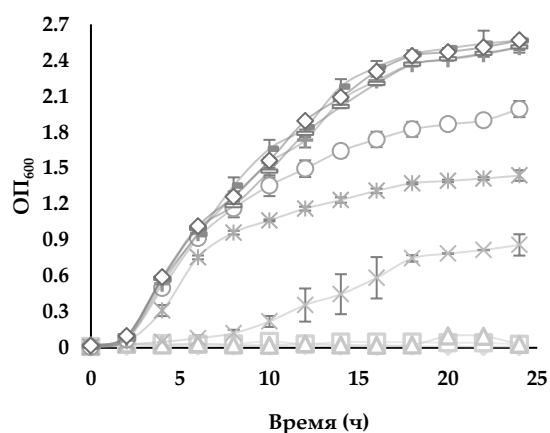
3.5. Влияние КВМЭ из жира личинок на кривые роста бактерий

Анализ кривой роста играет решающую роль в валидации антимикробных средств для борьбы с фитопатогенными заболеваниями [250]. Антимикробные эффекты КВМЭ против патогенных видов растений Xcc, Pagg, Dsol, Pcc и Pba были дополнительно оценены с

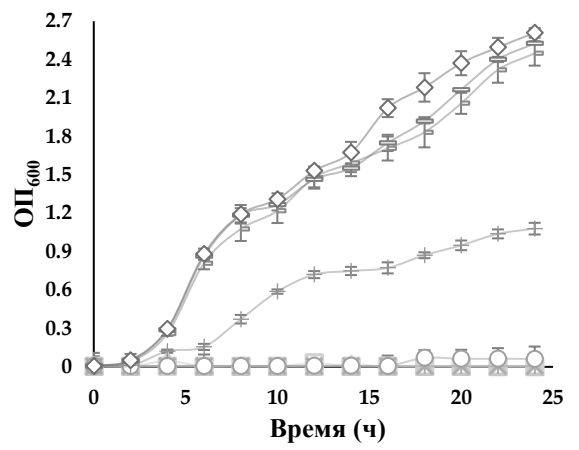
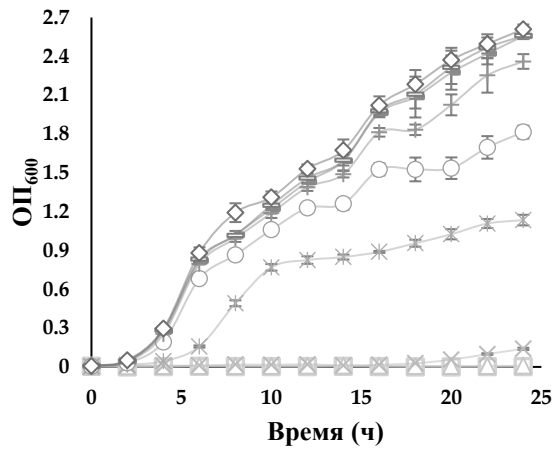
использованием турбидиметрического (ТБ) метода в диапазоне от 25 до 0,097 мг/мл концентрации КВМЭ (рисунок 9). Результаты ТВ анализа продемонстрировали увеличение антимикробной эффективности КВМЭ в зависимости от концентрации, аналогичное тому, которое наблюдалось при анализе диффузии агарового диска (рисунок 7). Измерение оптической плотности (ОП) клеточной суспензии при 600 нм в течение 24 ч показало влияние концентрации КВМЭ на пролиферацию бактерий. Как показано на рисунок 9, в присутствии 0,39 мг/мл КВМЭ бактериальная пролиферация замедлялась для всех штаммов на протяжении всего эксперимента, за исключением штамма Хсс, пролиферация которого восстановилась после 20 ч инкубации. Мы наблюдали разницу в скорости пролиферации между тестируемой и контрольной группами в поздней логарифмической фазе. Эта тенденция продолжалась на стационарной фазе, когда ОП культур достигал более высоких 2,4 единиц для контрольной группы, в то время как плотность среди бактерий, обработанных КВМЭ, находилась в диапазоне от 1,07 до 1,5 ОП₆₀₀. Кроме того, присутствие КВМЭ в концентрации 0,39 мг/мл задерживало время лаорифмической фазы до 6 ч для штаммов Pagg, Pba и Pcc, за исключением Хсс (рисунок 9).

Размножение бактерий в присутствии (П/С)

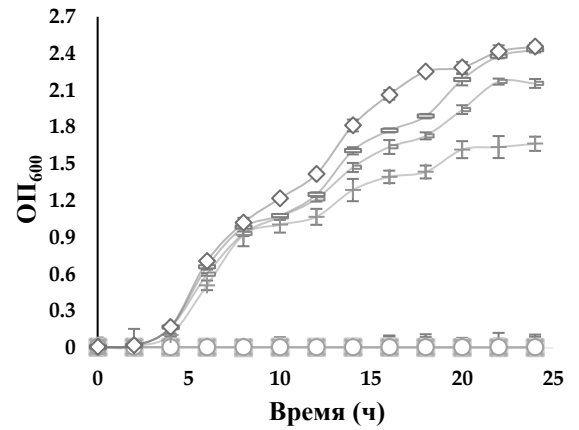
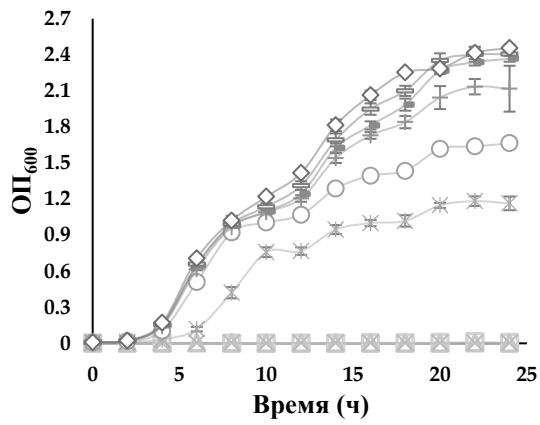
Размножение бактерий в присутствии КВМЭ



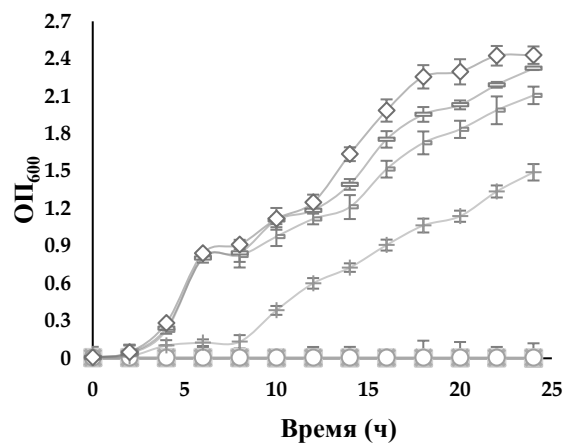
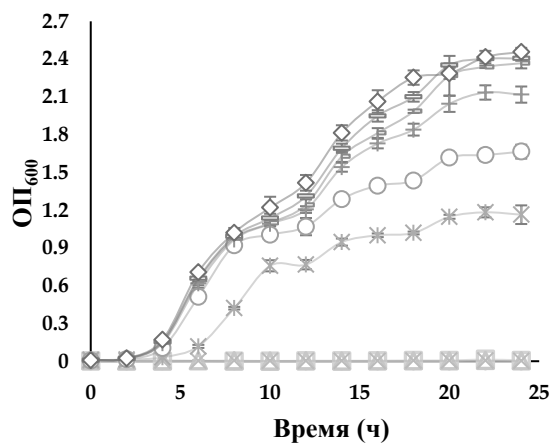
(a)



(б)



(в)



(г)

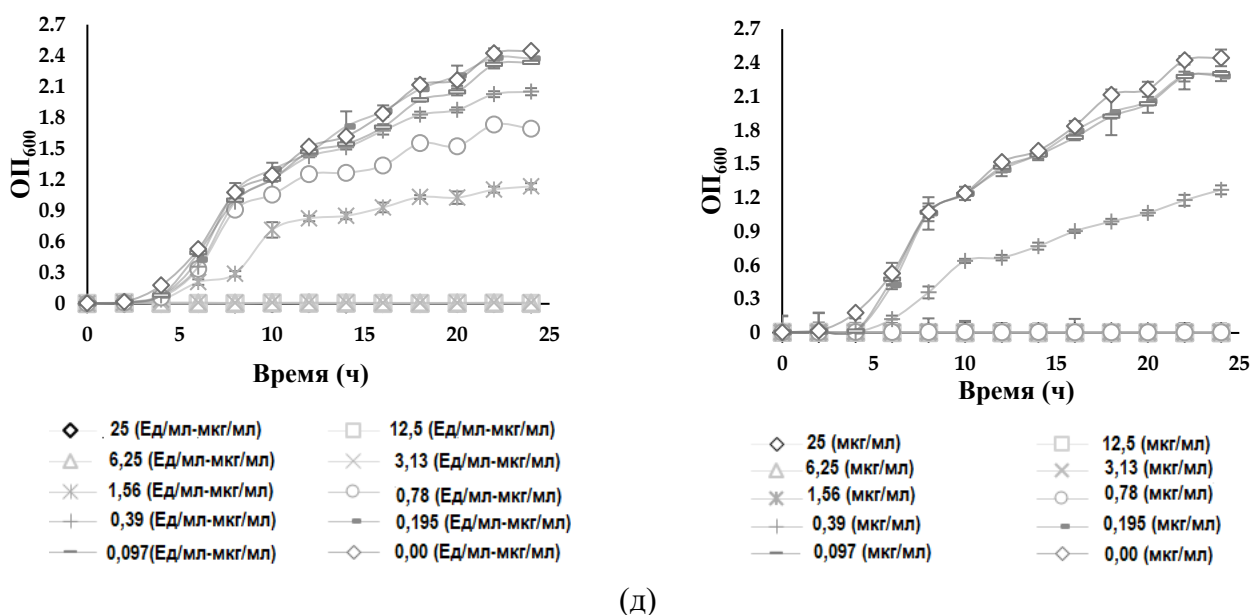


Рисунок 9. Турбидиметрический анализ проводили в стерильных 96-луночных планшетах в диапазоне концентраций КВМЭ от 25 до 0,0097 мг/мл и от 25 до 0,0097 мкг/мл П/С в трех повторах. Протестированы пять штаммов бактерий: (а) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; (б) *Pantoea agglomerans*; (в) *Dickeya solani*; (г) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* и (д) *Pectobacterium atrosepticum*. Каждое значение представляет собой среднее значение трех независимых экспериментов \pm SD (n = 3). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

3.6. Анализ экстракта КВМЭ методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС)

Газовая хроматография–масс–спектрометрия (ГХ-МС) - это усовершенствованный метод, используемый для исследования соединений с использованием времени удерживания относительной газовой хроматографии, дальнейшего разделения компонентов смеси в сочетании с масс-спектральными картинами фрагментации, которые относятся к химическим структурам обнаруженного соединения [251,252]. ГХ-МС имеет приоритет для анализа жирных кислот, поскольку он имеет хорошо зарекомендовавшие себя базы данных, используемые для идентификации жирных кислот, кроме того, он обладает более высокой селективностью и большей эффективностью, а также предоставляет больше структурной информации [253,254]. Количество и положение ненасыщенных двойных связей в ЖК можно легко определить с помощью обычной процедуры в ГХ-МС [74]. ГХ-МС-анализ КВМЭ был проведен для идентификации биоактивных молекул, содержащихся в изобилии в КВМЭ, который был извлечен из жира ЛМЧЛ. Идентифицированных органических соединений в КВМЭ жира

личинки было 34 (рисунок 10). Химический профиль этих соединений был определен на основе базы данных Национального института стандартов и технологий (NIST, США). После сравнения масс-спектра неизвестных компонентов КВМЭ с диапазоном известных химических веществ из библиотеки NIST сходство спектров ГХ-МС более 70% было рассмотрено в качестве основного критерия для этого выбора.

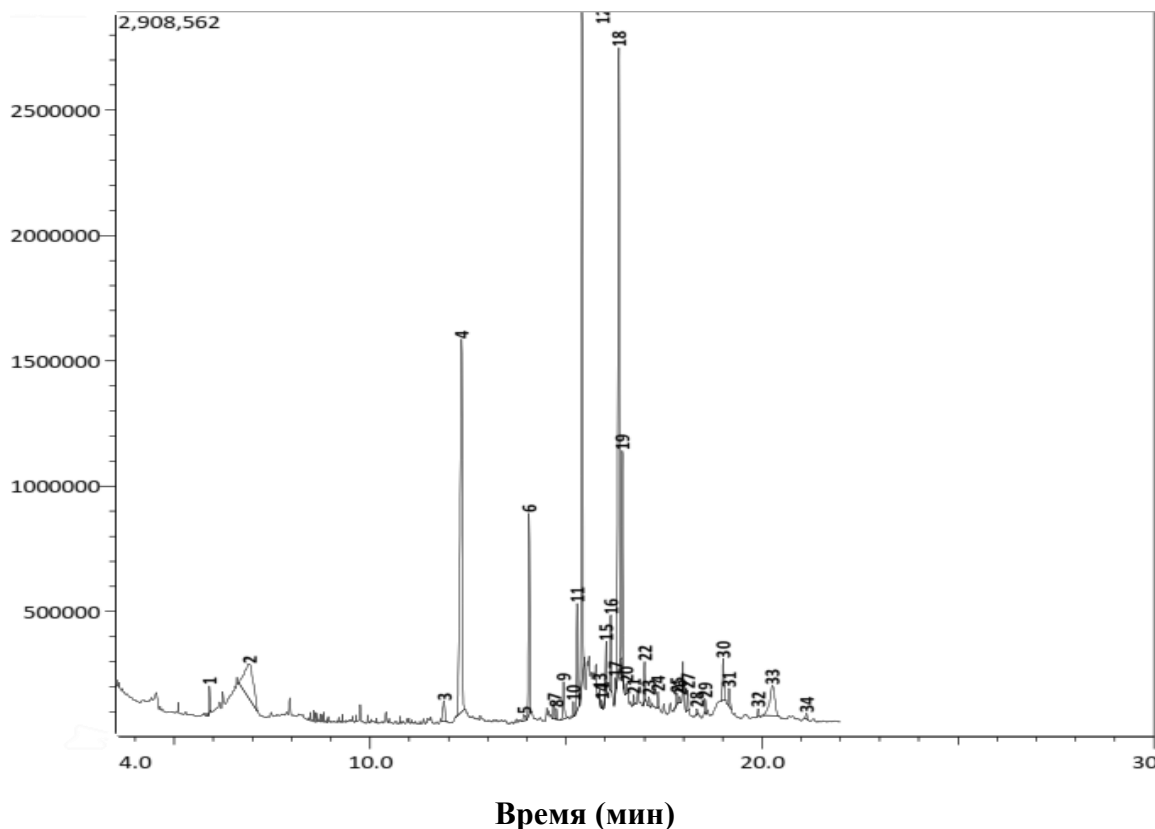


Рисунок 10. Газовая хроматография-масс-спектрометрическая (ГХ-МС) хроматограмма КВМЭ из жира ЛМЧЛ. Химическая идентичность 34 соединений из жира КВМЭ, обнаруженных с помощью ГХ-МС, была определена на основе Библиотеки химических соединений NIST.

Среди 13 доминирующих (>1%) органических соединений три наиболее распространенных составляли более 50% содержания, т.е. 22,22% октадек-9-эоновой кислоты (18:1, син. олеиновой кислоты), 20,34% n-гексадекановой кислоты (16:0, син. пальметиновая кислота) и 18,48% додекановой кислоты (12:0, син. лауриновая кислота) (таблица 5). Другие соединения были представлены в следовых количествах (менее 1%), но обладали интересной биологической активностью и оставались объектами нашего дальнейшего изучения. Для окончательного анализа были выбраны только соединения с высоким содержанием экстракта ($\geq 1\%$) или те, которые характеризуются в литературе антимикробной способностью (таблица 5).

Таблица 5. Химический состав КВМЭ из жира ЛМЧЛ

Номер пика	Время удерживания	Содержание (%)	Название соединения (Библиотека NIST)	Химическая формула	Молекулярная масса (г/моль)	Сходство (%)
1	5,9	0,61	1,2-Пропандиол, 3-хлор	$C_3H_7ClO_2$	110	93
2	6,92	6,88	1,2,3-Пропанетриол	$C_3H_8O_3$	92	97
3	11,888	1,02	бета.-D-Глюкопираноза, 1,6-ангидро	$C_6H_{10}O_5$	162	92
4	12,335	18,48	Додекановая кислота (лауриновая кислота)	$C_{12}H_{24}O_2$	200	97
5	13,335	0,3	2,4-Додекадиенал, (E, E) - (ароматическое вещество)	$C_{12}H_{20}O$	180	80
6	14,059	5,59	Тетрадекановая кислота (миристиновая кислота)	$C_{14}H_{28}O_2$	228	97
7	14,682	0,41	Додекановая кислота, этиловый эфир (виниловый эфир лауриновой кислоты)	$C_{14}H_{26}O_2$	226	81
8	14,753	0,24	Пентадекановая кислота (насыщенная жирная кислота)	$C_{15}H_{30}O_2$	242	83
9	14,937	1,17	3-циклопентилпропионовая кислота, 2-диметиламиноэтиловый эфир	$C_{12}H_{23}NO_2$	213	91
10	15,186	0,35	Метилловый эфир гексадекановой кислоты (метилловый эфир пальмитиновой кислоты)	$C_{17}H_{34}O_2$	270	88
11	15,286	3,02	цис-9-гексадеценная кислота (пальмитолеиновая кислота)	$C_{16}H_{30}O_2$	254	96
12	15,412	20,34	n-гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота)	$C_{16}H_{32}O_2$	256	96
13	15,858	0,18	Додекановая кислота, 2-гидрокси-1-(гидроксиметил) этиловый эфир	$C_{15}H_{30}O_4$	274	73

14	15,918	0,14	Гексадекановая кислота	$C_{16}H_{32}O_2$	256	78
15	16,02	1,32	Додекановая кислота, 2,3-дигидроксипропиловый эфир (монолаурин)	$C_{15}H_{30}O_4$	274	83
16	16,138	1,62	9-Октадеценовая кислота (Z)-, метиловый эфир (метиловый эфир олеиновой кислоты)	$C_{19}H_{36}O_2$	296	87
17	16,257	0,34	Октадеценовая кислота, метиловый эфир (метиловый эфир стеариновой кислоты)	$C_{19}H_{38}O_2$	298	86
18	16,347	22,22	Октадек-9-еновая кислота (олеиновая кислота)	$C_{18}H_{34}O_2$	282	95
19	16,437	5,34	Октадекановая кислота (стеариновая кислота)	$C_{18}H_{36}O_2$	284	94
20	16,537	0,27	Этиловый эфир линолевой кислоты	$C_{20}H_{36}O_2$	308	75
21	16,721	0,23	9,12-Октадекадиеновая кислота (Z, Z)-(линолевая кислота)	$C_{18}H_{32}O_2$	280	89
22	17,002	0,97	Фумаровая кислота, 2-диметиламиноэтилгептадециловый эфир	$C_{25}H_{47}NO_4$	425	82
23	17,114	0,24	Тетрадекановая кислота, 2-гидрокси-1-(гидроксиметил) этиловый эфир	$C_{17}H_{34}O_4$	304	86
24	17,346	0,36	Эйкозановая кислота (арахидиновая кислота)	$C_{20}H_{40}O_2$	312	92
25	17,821	0,35	Октановая кислота, 2-диметиламиноэтиловый эфир	$C_{12}H_{25}NO_2$	215	87
26	17,902	0,15	цис-9-Гексадеценал	$C_{16}H_{30}O$	238	83
27	18,1	0,51	Гексадекановая кислота, 2-гидрокси-1-(гидроксиметил) этиловый эфир	$C_{19}H_{38}O_4$	330	94
28	18,336	0,15	9-Октадеценовая кислота (Z)-	$C_{18}H_{34}O_2$	282	83
29	18,551	0,33	Тетрадеканамид	$C_{14}H_{29}NO$	227	91

30	19,011	1,45	9-Октадеценовая кислота, 1,2,3-пропантрииловый эфир, (Е, Е, Е)-	$C_{57}H_{104}O_6$	884	93
31	19,162	0,68	Олеилхлорид	$C_{18}H_{33}ClO$	300	90
32	19,905	0,22	Октадеканамид	$C_{18}H_{37}NO$	283	92
33	20,262	3,52	Додекановая кислота, 1,2,3-пропантрииловый эфир	$C_{39}H_{74}O_6$	638	85
34	21,134	0,2	Холестерин, пентафторпропионат	$C_{30}H_{45}F_5O_2$	532	88

Состав липидов в ЛМЧЛ варьирует в зависимости от способа обработки личинок, что может привести к различному профилю жирных кислот (ЖК) [37]. Липидный профиль личинок в основном богат лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, олеиновой, каприновой, линолевой и другими среднецепочечными жирными кислотами. Таким образом, миристиновая кислота обладает широким спектром антибактериальных эффектов [30], противолличиночной и репеллентной активностями [35]. В нескольких исследованиях было задокументировано, что ЛМЧЛ является устойчивым резервуаром антимикробных соединений, в частности жирных кислот [36,42,125,255,256].

Профиль ЖК, определенный с помощью анализа ГХ-МС представлен в таблице 5. В экстракте жира личинок было обнаружено 22,22% олеиновой и 3,02% пальметолеиновой мононенасыщенных жирных кислот, а также 20,34% пальмитиновой, 18,48% лауриновой, 5,59% миристиновой, 5,34% стеариновой мононенасыщенных жирных кислот с индексом сходства 96%, 97%, 97% и 94%, соответственно. Полиненасыщенные жирные кислоты (например, эйкозановая кислота (арахидоновая кислота) и полиненасыщенные жирные кислоты (например, цис, цис-9, 12-Октадекадиеновая кислота (Z, Z) (линолевая кислота)) присутствовали в следовых количествах, 0,36% и 0,23%, соответственно.

Более обильное количество насыщенных жирных кислот по сравнению с ненасыщенными, выявленное в КВМЭ, согласуется с результатами, опубликованными Ushakova *et al.* [45]. Они предположили, что жирные кислоты в ЛМЧЛ служат хранилищем энергии. Количество насыщенных жирных кислот преобладало, потому что эти химические вещества менее подвержены окислению, чем ненасыщенные жирные кислоты. Наш анализ ГХ-МС указывает на наиболее распространенные компоненты КВМЭ, что подтверждает, что основные ЖК были насыщенными ЖК и упорядочены в процентном отношении, как показано в таблице 5. Ewald *et al.* [257] сообщили, что из общего количества жирных кислот в личинках основную долю составляют лауриновая (C12:0), пальмитиновая (C16:0) и олеиновая (C18:1 n-9) кислоты (52%, 12-22% и 10-25%, соответственно). Наше исследование выявило гораздо более высокий профиль жирных кислот, и было показано, основываясь на нашем методе экстракции, что мы смогли извлечь из жира личинок ЛМЧЛ 22,22% олеиновой кислоты (C18:1 n-9), 20,34% пальмитиновой (C16:0) и 18,48% лауриновой кислоты (C12:0) (Таблица 5). Хотя в нескольких отчетах [18,32,33,258] показано различное количество лауриновой, пальмитиновой и олеиновой кислот, общепризнано, что различный процентный состав ЖК в основном зависят от вида субстрата для выращивания насекомых.

С другой стороны, широко пропагандируется информация о необходимости сокращения использования химических пестицидов путем разработки альтернативных стратегий или технологий для повышения устойчивости растений к болезням и борьбы с патогенами. Растет

интерес к исследованиям, посвященным альтернативным пестицидам и антимикробным активным соединениям, включая растительные экстракты и эфирные масла ароматических растений [259]. При определенных условиях мутации *de novo* и отбор могут развиваться у патогенных бактерий в течение от одной минуты до нескольких часов, что приводит к возникновению генов резистентности, что приводит к устойчивости бактерий к одному антибиотику [260]. Обнаруженные ЖК играют очень важную роль в повышении устойчивости растений к фитопатогенам. Таким образом, было обнаружено, что линолевая кислота индуцирует системную резистентность табака к бактериальному возбудителю мягкой гнили, вызываемому *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) [261]. Лауриновая кислота (ЛК) обладала наиболее мощной активностью в подавлении роста грамположительных бактерий. Его моноглицеридное производное (монолаурат глицерина, (ГМЛ)) проявляло еще более сильную ингибирующую активность, чем ЛК [100]. Важно отметить, что как ЛК, так и ГМЛ в изобилии встречаются в природе. Они признаны безопасными Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) в США и продемонстрировали полное противоионфекционное применение, включая несколько применений, например, в сельском хозяйстве [262].

Линолевые кислоты были фитотоксичны и эффективны в индуцировании системной резистентности. Напротив, олеиновая кислота была наименее фитотоксичной и не вызывала системной резистентности [263]. Согласно Blechert *et al.* [264], производное октадекановой кислоты (стеариновой кислоты), октадекатриеновая кислота, (*Z, Z*)-метиловый эфир играют важную роль в защитном механизме растений. Растение содержит линолевую кислоту, вызывающую индуцированную системную резистентность к фитопатогенам. Когда на растении возникает первичная рана, образуются олиго-галактурониды, которые активируют октадеканоеат с образованием жасмоновой кислоты, что в конечном итоге приводит к активации защитного гена [265]. Этиловый эфир гексадекановой кислоты действует как антиоксидант, нематцид и пестицид. Кроме того, он может способствовать антимикробной и антиоксидантной активности [266]. Как показано в настоящем исследовании, КВМЭ *H. illucens* жир личинок содержит олеиновую, пальмитиновую, лауриновую, миристиновую, стеариновую и пальмитолевую кислоты, которые представляют собой насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, обладающие значительным ингибирующим действием против бактерий, что согласуется с активностью жирных кислот, о которых сообщают другие авторы (таблица 6).

Таблица 6. Содержание и опубликованная биологическая активность основных компонентов КВМЭ жира личинок *H. Illucens*

Название соединения	Содержание (%)	Биологическая активность
Октадек-9-еновая кислота (олеиновая кислота)	22,22	Антибактериальный [267]
n-гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота)	20,34	Антибактериальный [268]
Додекановая кислота (лауриновая кислота)	18,48	Антибактериальный [269]
Тетрадекановая кислота (миристиновая кислота)	5,59	Антибактериальный [30]
Октадекановая кислота (стеариновая кислота)	5,34	Антибактериальный [270]
цис-9-Гексадеценовая кислота (пальмитолеиновая кислота)	3,02	Антибактериальный [271]
1,2,3-Пропанетриол	6,88	Противомикробное и антисептическое средство
Гексадекановая кислота, 2-гидрокси-1-(гидроксиметил) этиловый эфир	0,51	Противомикробный
цис-9-Гексадецен	0,15	Противомикробный [272]
9-Октадеценовая кислота (Z)-, метиловый эфир (метиловый эфир олеиновой кислоты)	1,62	Противомикробный [273]
Додекановая кислота, 2,3-дигидроксипропиловый эфир (монолаурин)	1,32	Противомикробный [274]
Эйкозановая кислота (арахидиновая кислота)	0,36	Антибактериальный, противогрибковый, антиоксидантный [275,276]
Метиловый эфир гексадекановой кислоты (метиловый эфир пальмитиновой кислоты)	0,35	Антибактериальные и противогрибковые [277]
Октадеценовая кислота, метиловый эфир (метиловый эфир стеариновой кислоты)	0,34	Противомикробный [278]
9,12-Октадекадиеновая кислота (Z, Z)-(линолевая кислота)	0,23	Антибактериальный [279]

Глава 4. Последовательные экстракты жира личинок *H. illucens* уничтожают патогенные рыбные бактерии

4.1. Тестирование на чувствительность к антибиотикам

Aeromonas spp. может приобретать механизмы устойчивости к противомикробным препаратам несколькими путями; он является кандидатом в качестве индикаторных бактерий для отслеживания распространения устойчивости к противомикробным препаратам в водной среде. Для изучения чувствительности к противомикробным препаратам клиницисты и эпидемиологи/микробиологи используют два разных подхода: клиницисты сосредотачиваются на триптическом микроорганизме/антибиотике/хозяине, а другие - на паре микроорганизм/антибиотик, чтобы распознать микроорганизмы как дикого типа, так и не дикого типа, что означает отсутствие или наличие какого-либо приобретенного, или мутационного механизма устойчивости к противомикробным препаратам, о которых идет речь. Таким образом, эпидемиологи/микробиологи исследовали эволюцию или появление бактериальных популяций, проявляющих резистентные признаки, независимо от любого терапевтического результата. К сожалению, на сегодняшний день критерии интерпретации для *Aeromonas* spp. в литературе мало данных о тестах на чувствительность к противомикробным препаратам. Эпидемиологические пороговые значения (англ. ECV) или (англ. ECOFFs), интерпретирующие критерии, называемые Институтом клинических и лабораторных стандартов (англ. CLSI) и Европейским комитетом по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам (англ. EUCAST), были получены из разных лабораторий и представляют верхний предел распределения данных МПК для полностью восприимчивых штаммов дикого типа. Среди *Aeromonas* ECV доступны только для вида *A. salmonicida* в отношении флорфеникола, триметоприм-сульфадиметоксина, окситетрациклина и оксолиновой кислоты либо для МПК, либо для диаметра зоны ингибирования (ДЗИ), полученного дисковой диффузией, и для гентамицина, эритромицина и триметоприм-сульфаметоксазола (только ДЗИ) [280]. В то время как чувствительность клинических изолятов *Aeromonas* к антибиотикам была тщательно изучена, меньше известно о штаммах, содержащихся в окружающей среде, и особенно о штаммах, полученных из рыбы. Поэтому мы сначала проверили восприимчивость двух основных патогенов рыб к ДЗИ с помощью дискового диффузионного анализа.

Устойчивость рыбных патогенных штаммов *A. salmonicida* и *A. hydrophila* к стандартным противомикробным агентам представляла восемь классов обычно используемых антибиотиков (рисунок S3 и таблица 7) с использованием измерений диаметров зон ингибирования через 12 ч и 24 ч инкубации и классифицировалась путем сравнения с показателями контрольных точек CLSI [280].

Таблица 7. Чувствительность (ДЗИ) к *Aeromonas* spp. к антибиотикам

Антибиотик	ДЗИ (мм)							
	<i>A. hydrophila</i>		<i>A. salmonicida</i>		Контрольные значения			
	12 h	24 h	12 h	24 h	Р	П	Ч	
Г	16,4 (Ч)	16,2 (Ч)	17,33 (Ч)	17,1 (Ч)	≤12	13–14	≥15	
Хл	22,68 (Ч)	22,18 (Ч)	25,15 (Ч)	22,58 (Ч)	≤12	13–17	≥18	
К	24,65 (Ч)	24,08 (Ч)	27,48 (Ч)	26,1(Ч)	≤13	14–17	≥18	
Док	22,7 (Ч)	22,1 (Ч)	13,8 (Р)	10,7 (Р)	<17	17–18	≥19	
П/С	12,75 (П)	12,2 (П)	13,88 (П)	13,87 (П)	≤11	12–14	≥15	
КТ	10,53 (П)	10,4 (П)	9,23 (Р)	8,78 (Р)	≤10	-	≥11	
РД	14,08 (Р)	11,85 (Р)	14,93 (Р)	12,93 (Р)	≤16	17–19	≥20	
Э	12,63 (Р)	10,33 (Р)	12,78 (Р)	12,53 (Р)	≤13	14–22	≥23	
ВА	0,0 (Р)	0,0 (Р)	0,0 (Р)	0,0 (Р)	-	-	≥15	
П	0,0 (Р)	0,0 (Р)	0,0 (Р)	0,0 (Р)	≤28	-	≥29	

Обозначения: Г, гентамицин; Хл, хлорамфеникол; К, канамицин; Док, доксициклин; П/С, пенициллин-стрептомицин; КТ, колистин; РД, рифампицин; Э, эритромицин; ВА, ванкомицин; П, пенициллин; Р, резистентный; П, промежуточный; Ч, чувствительный; (0), означает отсутствие зоны ингибирования вокруг диска на пластине; (-), не определено.

Десять антибиотиков из восьми различных химических групп, используемых в концентрации, рекомендованной производственной компанией, включая: (1) аминогликозиды - пенициллин/стрептомицин (П/С, 100 Ед/мл–100 мкг/мл/диск); канамицин (К, 1000 мкг/диск); гентамицин (Г, 200 мкг/мл/диск); (2) тетрациклины-Доксициклин (Док, 100 мкг/мл/диск); (3) фениколы-хлорамфеникол (Хл, 1000 мкг/мл/диск); (4) пенициллин (П, 2U/диск); (5) гликопептиды-ванкомицин (ВА, 5 мкг/диск), (6) макролиды -эритромицин (Э, 60 мкг/диск); (7) ансамицины: рифампицин (РД, 15 мкг/диск) и (8) липопептиды - колистин (10 мкг/диск). Оба испытанные штаммы *A. hydrophila* и *A. salmonicida* продемонстрировали способность бактерий к множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). *A. salmonicida* была более устойчива, чем *A. hydrophila*, к шести различным группам антибиотиков, включая пенициллин, ванкомицин, эритромицин, доксициклин, рифампицин и колистин. *A. hydrophila* была умеренно чувствительна к колистину (КТ) и устойчива к доксициклину (Док). Следует отметить, что оба штамма были на 100% устойчивы к пенициллину и ванкомицину без видимой зоны ДЗИ вокруг

дисков антибиотиков. У обоих штаммов наблюдалась промежуточная чувствительность к пенициллину-стрептомицину (П/С). Таким образом, *A. salmonicida* была устойчива к 60%, в то время как *A. hydrophila* была устойчива к 50% от общего числа десяти антибиотиков, использованных в этом тесте. Интересно, что обработка рифампицином, эритромицином и хлорамфениколом показала наиболее резкое снижение ДЗИ после 24 ч инкубации у штаммов *A. hydrophila* и *A. salmonicida* (таблица 7, рисунок S3). В этом отношении наши данные значительно дополняют и подтверждают предыдущее исследование [281] чувствительности к антибиотикам того же рода бактерий (*Aeromonas* spp.), у которых также наблюдалась устойчивость к ампициллину.

Измерение ДЗИ через 12 ч и 24 ч продемонстрировало уменьшение со временем диаметра зоны ингибирования, вызванного различными противомикробными препаратами. Интересно, что обработка рифампицином, эритромицином и хлорамфениколом показала наиболее резкое снижение ДЗИ после 24-часовой инкубации у штаммов *A. hydrophila* и *A. salmonicida*, как показано в таблице 7 и на рисунок S3. Хотя антибиотики широко используются для лечения и контроля заболеваний рыб, многие проблемы подтвердили, что они представляют угрозу для человека, животных и водных ресурсов [282,283]. Согласно нашим результатам, доксициклин в качестве положительного контроля оказался более чувствительным к *A. hydrophila*, в то время как *A. salmonicida* проявлял высокую устойчивость к доксициклину по сравнению с КВМЭЗ; оба штамма были чувствительны к КВМЭЗ. Тетрациклин и его производные, такие как доксициклин и окситетрациклин, являются наиболее опасной группой антибиотиков в экосистеме. Они обычно используются в аквакультуре для лечения бактериальных заболеваний рыб, таких как вибриоз, флавобактериоз и эритродермит. С другой стороны, этот антибиотик с трудом удаляется из очистных сооружений и известен своим нецелевым действием в водной среде. Кроме того, он оказывает генотоксическое действие на радужную форель, вызывая повреждение ДНК и разрывы хромосом при остром и хроническом воздействии. При низких концентрациях 20-200 мг/л он влияет на гематологические маркеры, такие как гемоглобин, гематокрит и количество эритроцитов, а также на активность таких ферментов, как аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ) и дегидрогеназа (ЛДГ) у карпа. Кроме того, он вызывает повреждение ДНК в эритроцитах при воздействии на молодь тилапии в экологически приемлемой концентрации 4 мкг/л. Доксициклин вызывает изменения в морфологии кишечника и микробиоте у видов тилапии [282].

4.2. Последовательная экстракция жира ЛМЧЛ

Как мы продемонстрировали в нашей предыдущей работе, биоактивные соединения из экстракта КВМЭ, полученные с использованием разработанного нами протокола экстракции

жира ЛМЧЛ, продемонстрировали высокий уровень антимикробной активности в отношении широкого спектра бактериальных фитопатогенов [31]. В попытке улучшить процедуру экстракции мы применили три раунда последовательной экстракции из одной и той же биомассы жира ЛМЧЛ, используя один и тот же протокол, основанный на кислотном водно–метанольном экстракционном растворе 90:9:1 (об/об), чтобы получить набор последовательных экстрактов (ПЭ), названный КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3 (рисунок 11). Общее количество биологически активных соединений для каждого ПЭ составило 60 мг, 40 мг и 30 мг для КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3, соответственно. Выход последовательных наборов соответствует 2%, 1,33% и 1% для КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3, соответственно, из начальных 3 г жира личинок.

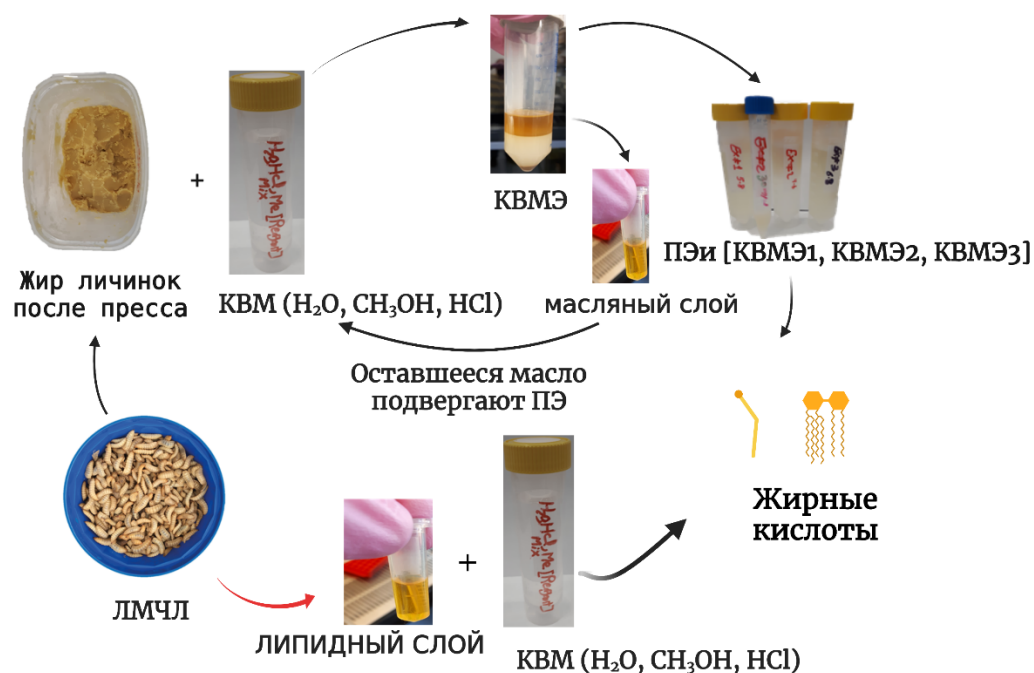
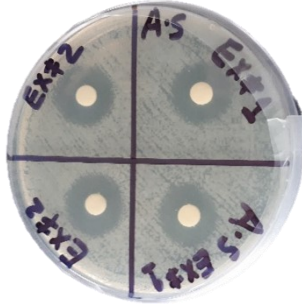
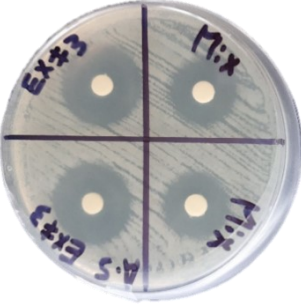
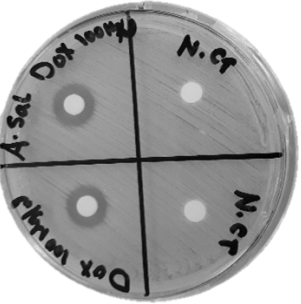
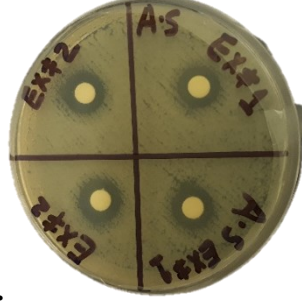


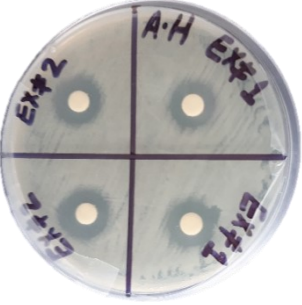
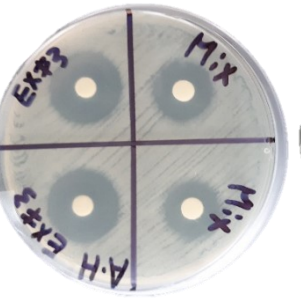



Рисунок 11. Этапы ПЭ процедуры выделения антибактериальных соединений из жира личинок *H. illucens*.

4.3. Тестирование антибактериальной чувствительности *Aeromonas* spp. к результатам ПЭ

Антибактериальную активность ПЭ определяли отдельно для каждого экстракта, используя измерения диаметров зон ингибирования через 12 ч и 24 ч инкубации. Кроме того, мы оценили смесь из трех равных объемов ПЭ, доведенных до той же конечной концентрации 40 мг/мл. ДЗИ вокруг дисков, загруженных КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3, а также их смесью, показаны на рисунке 12.

Время	<i>A. salmonicida</i>		
12 ч	 <p data-bbox="549 674 576 712">a)</p>	 <p data-bbox="879 674 906 712">б)</p>	 <p data-bbox="1201 674 1228 712">в)</p>
24 ч	<i>A. salmonicida</i>		
	 <p data-bbox="571 1167 598 1205">a)</p>	 <p data-bbox="887 1167 914 1205">б)</p>	 <p data-bbox="1198 1167 1225 1205">в)</p>
12 ч	<i>A. hydrophila</i>		
	 <p data-bbox="563 1664 590 1702">a)</p>	 <p data-bbox="874 1664 901 1702">б)</p>	 <p data-bbox="1201 1664 1228 1702">в)</p>
24 ч	<i>A. hydrophila</i>		

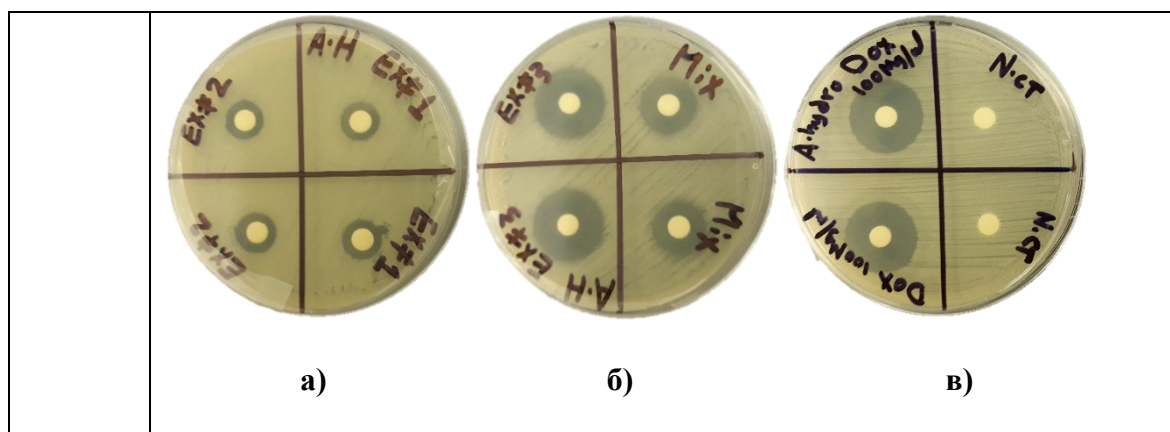


Рисунок 12. Восприимчивость *A. hydrophila* и *A. salmonicida* к экстрактам, полученным в ходе трех последовательных экстракций, определяли методом дисковой диффузии. Диски, загруженные в двух повторах с 50 мкл (а) КВМЭ1 (ЭК1) и КВМЭ2 (ЭК2); (б) КВМЭ3 (ЭК3) и смесью трех ПЭ (смеси) в концентрации 40 мг/мл; (в) Положительный контроль (доксциклин, 100 мкг/мл) и реагент для экстракции в качестве отрицательного контроля (ОК).

Диаметр зоны ингибирования варьировался от $11,4 \pm 0,14$ мм до $12,72 \pm 0,22$ мм для КВМЭ1, в то время как КВМЭ2 регистрировал $11,95 \pm 0,37$ мм, $12,7 \pm 0,22$ мм против *A. hydrophila* и *A. salmonicida*, соответственно, к 24 часам инкубации при концентрации 40 мг/мл. ДЗИ, вызванный КВМЭ1, был менее значимым (** $p < 0,0047$), чем другие ПЭ (КВМЭ2, КВМЭ3), через 12 ч инкубации против *A. salmonicida*, как показано на рисунке 13. Диаметр зоны ингибирования, вызванный КВМЭ3, был значительно выше (**** $p < 0,0001$), чем для всех других последовательных экстрактов после 12 ч и 24 ч инкубации, как показано на рисунке 13. КВМЭ3 продемонстрировал наиболее значительную зону ингибирования с размерами $21,47 \pm 0,14$ мм, $20,83 \pm 0,22$ мм против *A. hydrophila* и *A. salmonicida*, соответственно, к 24 часам инкубации. Активность смеси трех экстрактов была ниже, чем у одного КВМЭ3. Примечательно, что в то время, как чувствительность *A. hydrophila* к КВМЭ3 и доксициклину (рекомендуемый положительный контроль) была почти одинаковой, *A. salmonicida* была значительно (**** $p < 0,0001$) более чувствительна к КВМЭ3, по сравнению с положительным контролем. Наши данные показали, что последовательная процедура экстракции постепенно усиливала антимикробную активность ПЭ в отношении патогенных рыбных бактерий.

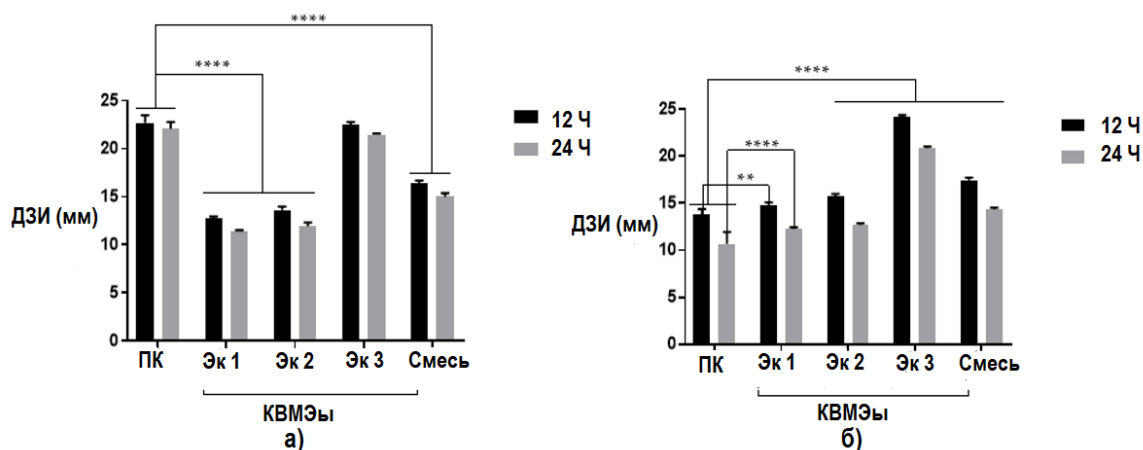


Рисунок 13. Восприимчивость (а) штаммов бактерий *A. hydrophila* и (б) *A. salmonicida* к различным ПЭ, измеренная методом дисковой диффузии. Бактерии подвергали воздействию КВМЭ1 (ЭК1), КВМЭ2 (ЭК2) и КВМЭ3 (ЭК3), соответственно, и смеси из трех экстрактов (Смесь), доведенной до той же концентрации 40 мг/мл. Значения ДЗИ рассчитывали после 12 ч и 24 ч инкубации при 26 °С путем измерения диаметра зон ингибирования (ДЗИ), окружающих диски (в мм). Доксициклин (Док) 100 мкг/мл используется в качестве рекомендуемого антибактериального положительного контроля. Все значения представлены в виде среднего \pm SD в трех повторах ($n = 3$). Все результаты анализировались с помощью двустороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные представлены как достоверная разница при сравнении с положительным контролем, а р-значение $< 0,05$.

4.4. КВМЭ3 демонстрирует дозозависимую антимикробную активность

Различные концентрации КВМЭ3 были протестированы как против штаммов *A. hydrophila*, так и *A. salmonicida* (рисунок 14), и полученные значения ДЗИ представлены на рисунке 15.

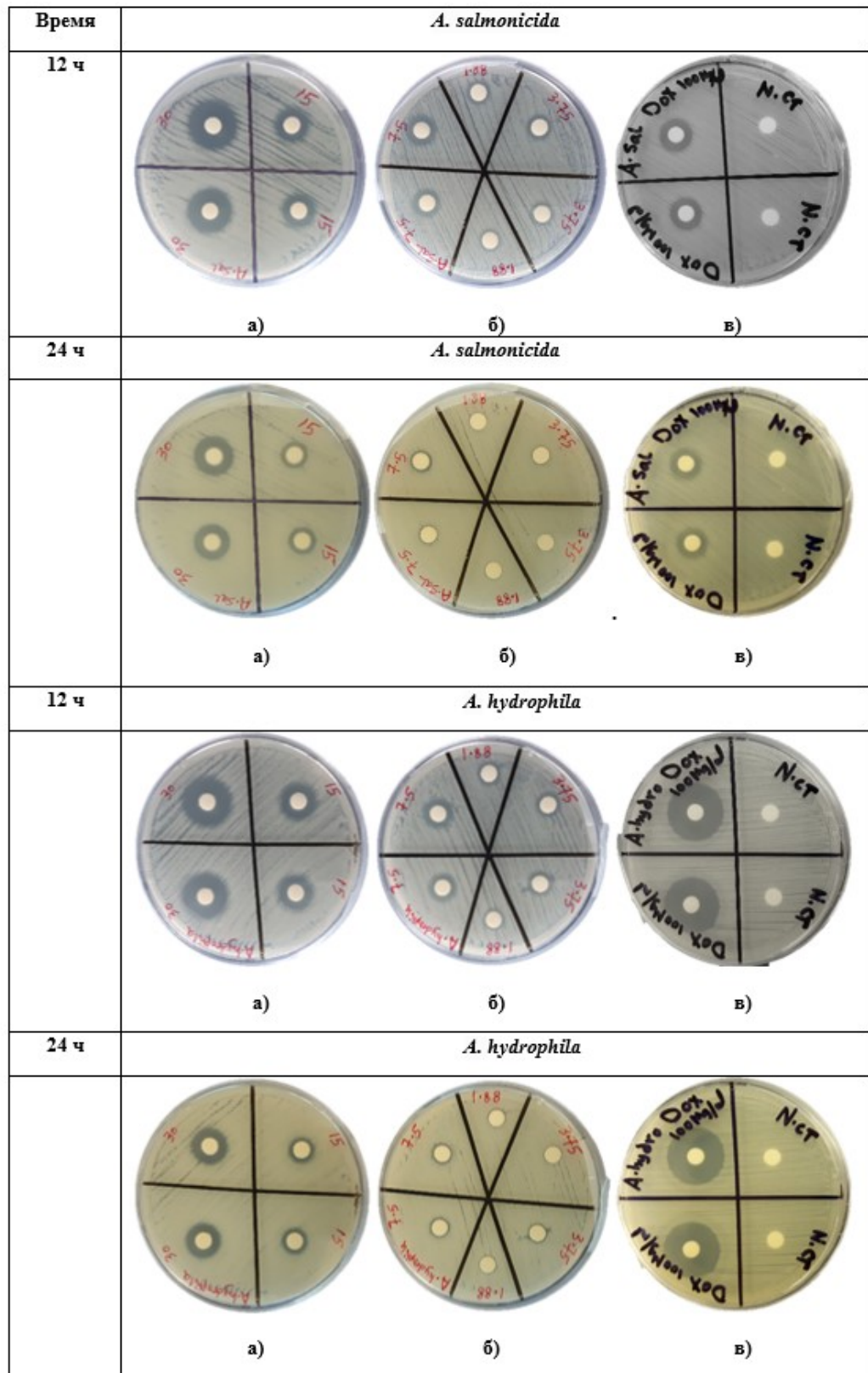


Рисунок 14. Дозозависимая восприимчивость *A. hydrophila* и *A. salmonicida*, определенная методом дисковой диффузии КВМЭЗ. (а, б) ДЗИ, образованный вокруг дисков, загруженных КВМЭЗ, при испытанных концентрациях в диапазоне 1,88–40 мг/мл после 12 ч и 24 ч инкубации; (в) Положительный контроль (доксциклин 100 мкг/мл) и отрицательный контроль

(экстракционный раствор смеси КВМ, ОК) определяли через 12 ч и 24 ч инкубации. Среднее значение ДЗИ для каждого условия, зарегистрированное в трех независимых экспериментах.

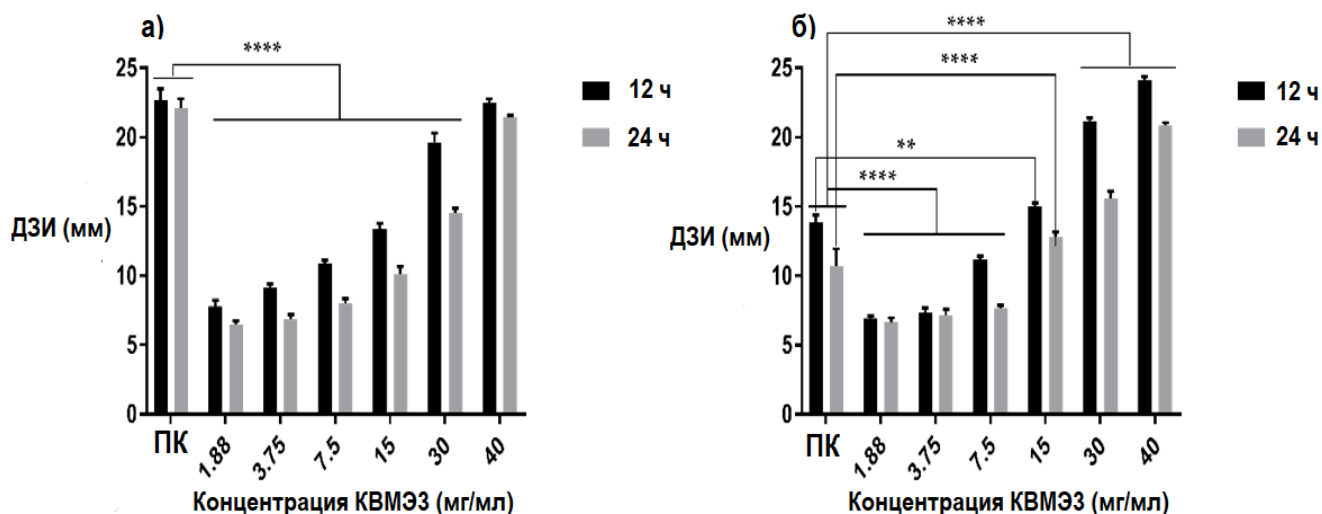


Рисунок 15. Восприимчивость *A. hydrophila* (а) и *A. salmonicida* (б) определяли методом дисковой диффузии КВМЭЗ (третий последовательный экстракт) жира ЛМЧЛ. Штаммы бактерий подвергали воздействию концентраций 1.88, 3.75, 7.5, 15, 30, и 40 мг/мл КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ. ДЗИ измеряли через 12 ч и 24 ч инкубации при 26 °С путем измерения ДЗИ, окруженного дисками. Доксициклин (Док) используется в качестве рекомендуемого положительного антибактериального контроля. Все значения представлены в виде среднего \pm SD трех ($n = 3$) независимых экспериментов. Данные были проанализированы с помощью двустороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные представляли собой достоверную разницу по сравнению с положительным контролем, а p -значение составляло $<0,05$.

Дозозависимая чувствительность штаммов *A. hydrophila* и *A. salmonicida* наблюдалась в размерах зоны ингибирования штаммов *A. hydrophila* и *A. salmonicida*, когда они подвергались воздействию КВМЭЗ в течение 12 ч и 24 ч с концентрациями в диапазоне от 1,88 до 40 мг/мл (рисунок 15). В частности, *A. salmonicida* был более чувствителен к КВМЭЗ, чем *A. hydrophila*, демонстрируя при этом более значительные (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$), чем положительные контрольные значения ДЗИ при концентрациях 15-40 мг/мл как через 12, так и через 24 часа. КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ доказал свою способность подавлять патогенные для рыбы бактерии *A. salmonicida* в зависимости от дозы.

4.5. Тестирование антибактериальной чувствительности *Aeromonas* spp. к ПЭ с помощью анализов МПК и МБК

В настоящее время в EUCAST нет эпидемиологических предельных значений для *Aeromonas* для интерпретации МПК. В то время как МПК — это самая низкая концентрация антибактериального агента, необходимая для подавления видимого роста, МБК — это

минимальная концентрация антибактериального агента, которая приводит к гибели бактерий, определяемой невозможностью повторного культивирования бактерий. Чем ближе МПК находится к МБК, тем более бактерицидным является соединение [284].

Антибактериальную активность КВМЭ1, КВМЭ2, КВМЭ3 и смеси всех трех ПЭ, проявляющих широкий спектр антимикробной активности, определяли методом анализа титрования бульона для оценки значений (МПК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК) в отношении двух грамотрицательных патогенов рыб, как показано в таблице 8. Результаты показали самую высокую бактерицидную активность (как в МПК, так и в МБК) КВМЭ3 против обоих тестируемых грамотрицательных патогенов *Aeromonas*, постепенно снижающуюся от второго (КВМЭ2) к первому (КВМЭ1) последовательных экстрактов. Смесь КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3 (смесь) оказалась менее эффективной, чем только КВМЭ3, хотя и более эффективной, чем-либо КВМЭ1, либо КВМЭ2 отдельно. Как КВМЭ3, так и смесь были более бактерицидными против *A. salmonicida*, чем против *A. hydrophila*, на что указывают их равные значения МПК и МБК. Удивительно, но *A. salmonicida* оказалась менее чувствительной как к КВМЭ3, так и к доксициклину по сравнению с *A. hydrophila*, о чем свидетельствуют более высокие значения МПК. Эти результаты еще раз подтвердили нашу гипотезу о том, что КВМЭ3 является наиболее активным экстрактом среди всех трех ПЭ и может ингибировать патогенные рыбные бактерии при самой низкой дозе.

Таблица 8. МПК и МБК ПЭ против рыбопатогенных бактерий *Aeromonas* spp

Антибактериальный экстракт	Параметр	Концентрация (мкг/мл)	
		<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
КВМЭ1	МПК	1500	1880
	МБК	1500	1880
КВМЭ2	МПК	940	940
	МБК	1880	1880
КВМЭ3	МПК	95	380

	МБК	190	380
Смесь	МПК	730	940
	МБК	1460	940
Положительный контроль (доксциклин)	МПК	0,25	6,25
	МБК	0,5	12,5

Обозначения. МПК: Минимальная концентрация ингибирования; МБК: Минимальная бактерицидная концентрация; Смесь: Смесь ПЭ в равных объемах КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3, доведенных до одинаковой концентрации перед обработкой бактерий *A. hydrophila* и *A. salmonicida*.

Основываясь на наших результатах, КВМЭ3 был выбран для дальнейшей оценки этого экстракта как потенциального антимикробного действия против грамотрицательных бактериальных патогенов рыб. Впервые мы продемонстрировали, что КВМЭ3, выделенный из жира ЛМЧЛ, ингибировал и убивал бактерии при более низких дозах МПК (0,095-0,38 мг/мл) и МБК (0,19-0,38 мг/мл) по сравнению с активными соединениями, выделенными из *Salix babylonica*, которые ингибировали рост *A. hydrophila* при МПК, МБК (25, 100 мг/мл) соответственно [285]. КВМЭ3 также был более эффективным, чем метанольный экстракт из семян и цветков *Michellia champaca*, который ингибировал рост *A. hydrophila* при 31,3 и 15,6 мг/мл, соответственно [286]. Наш экстракт КВМЭ3 был более активным, чем экстракты из *Diadema setosum* (морского ежа), которые содержат полиненасыщенные жирные кислоты, и зафиксировал ДЗИ $18,33 \pm 0,58$ мм при концентрации 50 мг/мл, в то время как МПК и МБК составляли 6,25 и 12,5 мг/мл, соответственно, против *A. hydrophila* [287]. МПК для коричневого альдегида находился в диапазоне 128-512 мкг/мл, в то время как значения МБК варьировались от 256 до 1024 мкг/мл для различных изолятов *A. hydrophila* [288]. Эмодин может уничтожить *A. hydrophila* в дозе 2,5 мг/мл [289], в то время как олеиновая кислота ингибирует как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии в концентрации 0,5 мг/мл после 15-минутной обработки [95]. Несмотря на это, антибактериальные вещества из метаболитов корней *Vitis rotundifolia* (мускатного ореха) [290] продемонстрировали МПК от 10 до более 100 мкг/мл против патогенных рыбных бактерий, хотя они проявляли бактериостатические свойства. В настоящем исследовании КВМЭ3 был наиболее эффективным антибактериальным веществом из

жира ЛМЧЛ и мог уничтожать и ингибировать патогенные бактерии рыбы в низкой дозе. Высокая активность КВМЭЗ может стать альтернативой антибиотикам в аквакультурных средах обитания; следовательно, она обладает потенциалом для уничтожения и лечения МЛУ-рыбных бактерий.

4.6. МПК50 и кривые роста с КВМЭЗ против *Aeromonas* spp

Средние значения половины минимальной концентрации ингибирования (МПК50), а также диапазон полученных значений являются важными параметрами для представления результатов тестирования чувствительности при тестировании нескольких изолятов данного вида. Значение МПК50 представляет собой значение МПК, при котором ингибируется $\geq 50\%$ изолятов в тестируемой популяции; оно эквивалентно среднему значению МПК. Концентрацию КВМЭЗ доводили до нужной концентрации путем смешивания антимикробного сырья со средой. Антимикробное средство последовательно разбавляли в нескольких лунках для получения градиента. Микробы были получены из одной и той же колониеобразующей единицы в правильной концентрации, скорректированной до 5×10^5 КОЕ/мл и МПК50 определяли через 6 ч, 12 ч и 24 ч путем измерения мутности (ОП₆₀₀) тестируемых штаммов [280] и представлены на рисунке 16 и в таблице 9.

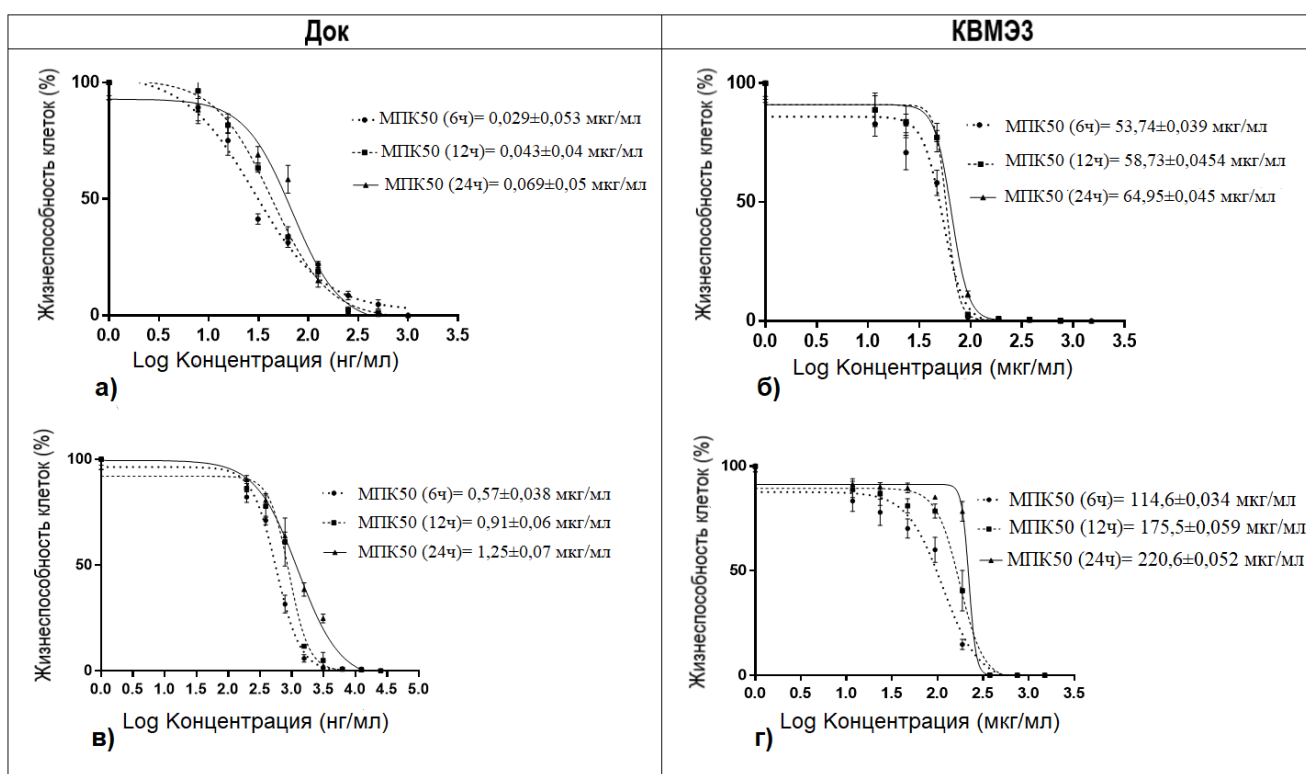


Рисунок 16. МПК50 патогенных бактерий рыб, обработанных КВМЭЗ из жира личинок, по сравнению с доксициклином (контрольный антибиотик). МПК50 определяли на основе данных

турбидиметрического анализа и сравнивали с положительным контрольным доксициклином (Док). Мутность патогенных клеток оценивали через 6 ч, 12 ч и 24 ч инкубации. *A. hydrophila*, обработанный (а) доксициклином (Док) и (б) КВМЭЗ; *A. salmonicida*, обработанный (в) доксициклином (Док) и (г) КВМЭЗ. Значения МПК50 рассчитаны с использованием модели нелинейной регрессии программного обеспечения Graphpad Prism 7. Полученные значения представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения. Значения МПК50 как среднее значение трех независимых экспериментов \pm среднее значение ошибки стандартного отклонения (SEM).

Таблица 9. Антимикробная эффективность КВМЭЗ и доксициклина (Док) против *Aeromonas* spp. в разное время инкубации

Виды бактерий	Док (мкг/мл)			КВМЭЗ (мкг/мл)		
	6 ч	12 ч	24 ч	6 ч	12 ч	24 ч
<i>A. hydrophila</i>	0,029 \pm 0,05	0,043 \pm 0,04	0,069 \pm 0,05	53,74 \pm 0,039	58,73 \pm 0,045	64,95 \pm 0,045
<i>A. salmonicida</i>	0,57 \pm 0,038	0,91 \pm 0,06	1,25 \pm 0,07	113,6 \pm 0,044	175,5 \pm 0,059	220,6 \pm 0,052

Сравнение значений МПК50 показало, что штамм *A. salmonicida* продемонстрировал более высокую устойчивость к Док, чем штамм *A. hydrophila*, за все испытанные промежутки времени (увеличение МПК50 более чем в 18 раз). С другой стороны, оба штамма отличались меньшей чувствительностью к КВМЭЗ в любой момент времени (всего 2-3-кратная разница значений МПК50). Сравнивая наши результаты с результатами Kot *et al.* [291,292], оказалось, что КВМЭЗ наиболее эффективен против *Aeromonas* spp.

Влияние КВМЭЗ и доксициклина (рекомендуемый положительный контроль антибиотиков) на количество живых клеток в бактериальной популяции в течение 24-часового периода пролиферации *A. hydrophila* и *A. salmonicida*, измеренное с помощью турбидиметрического анализа, показано на рисунке 17. Обработка КВМЭЗ в концентрациях ≤ 24 мкг/мл продлевала лаг-фазу роста *A. hydrophila* до 4 часов, в то время как в присутствии Док в концентрациях $\leq 0,125$ мкг/мл составляла всего 2 часа. Запоздывающая фаза *A. salmonicida* при обработке как КВМЭЗ в концентрациях ≤ 190 мкг/мл, так и Док в концентрациях $\leq 0,78$ мкг/мл составляли два часа. Не было экспоненциальной (или логарифмической) фазы роста *A. hydrophila* при обработке как КВМЭЗ в концентрациях ≥ 190 мкг/мл, так и Док в концентрациях $\geq 0,250$ мкг/мл, тогда как *A. salmonicida* не росла при обработке как КВМЭЗ, так и Док в концентрациях ≥ 380 мкг/мл и $\geq 6,25$ мкг/мл, соответственно. Примечательно, что обработка КВМЭЗ в

концентрации 95 мкг/мл задерживала пролиферацию *A. hydrophila* до 12 ч, в то время как медленное деление *A. salmonicida* начался только после 8 часов. Напротив, обработка Док при любых концентрациях $\leq 0,125$ мкг/мл не задерживала время появления логарифмической фазы *A. hydrophila*, в то же время задерживая мелкий логарифмический рост *A. salmonicida* до 10 ч только при концентрациях в диапазоне 1,56–3,12 мкг/мл. При обработке КВМЭЗ ≤ 12 мкг/мл стационарная фаза *A. hydrophila* начала проявляться только с 20 ч с дальнейшим незначительным прогрессированием, в то время как КВМЭЗ в концентрациях ≤ 95 мкг/мл индуцировал меньшую экспрессию стационарной фазы деления *A. salmonicida* и задержку появления фазы до 18 ч при концентрации 190 мкг/мл. Док индуцировал стационарную фазу *A. hydrophila*, которая начиналась с 8 ч при концентрации 0,125 мкг/мл, а затем постепенно снижалась с 18 ч до 8 ч в пределах уменьшения концентраций с 0,063 мкг/мл до 0,008 мкг/мл. Тот же антибиотик способствовал появлению стационарного типа деления *A. salmonicid*, начиная с двадцати часов при концентрациях 1,56–3,12 мкг/мл и менее очевидное стационарное деление с 12 часов с дальнейшим неглубоким прогрессированием в диапазоне концентраций 0,19–0,78 мкг/мл.

Положительный контроль (Док) подавляет
рост бактерий

Экстракт КВМЭЗ подавляет рост бактерий

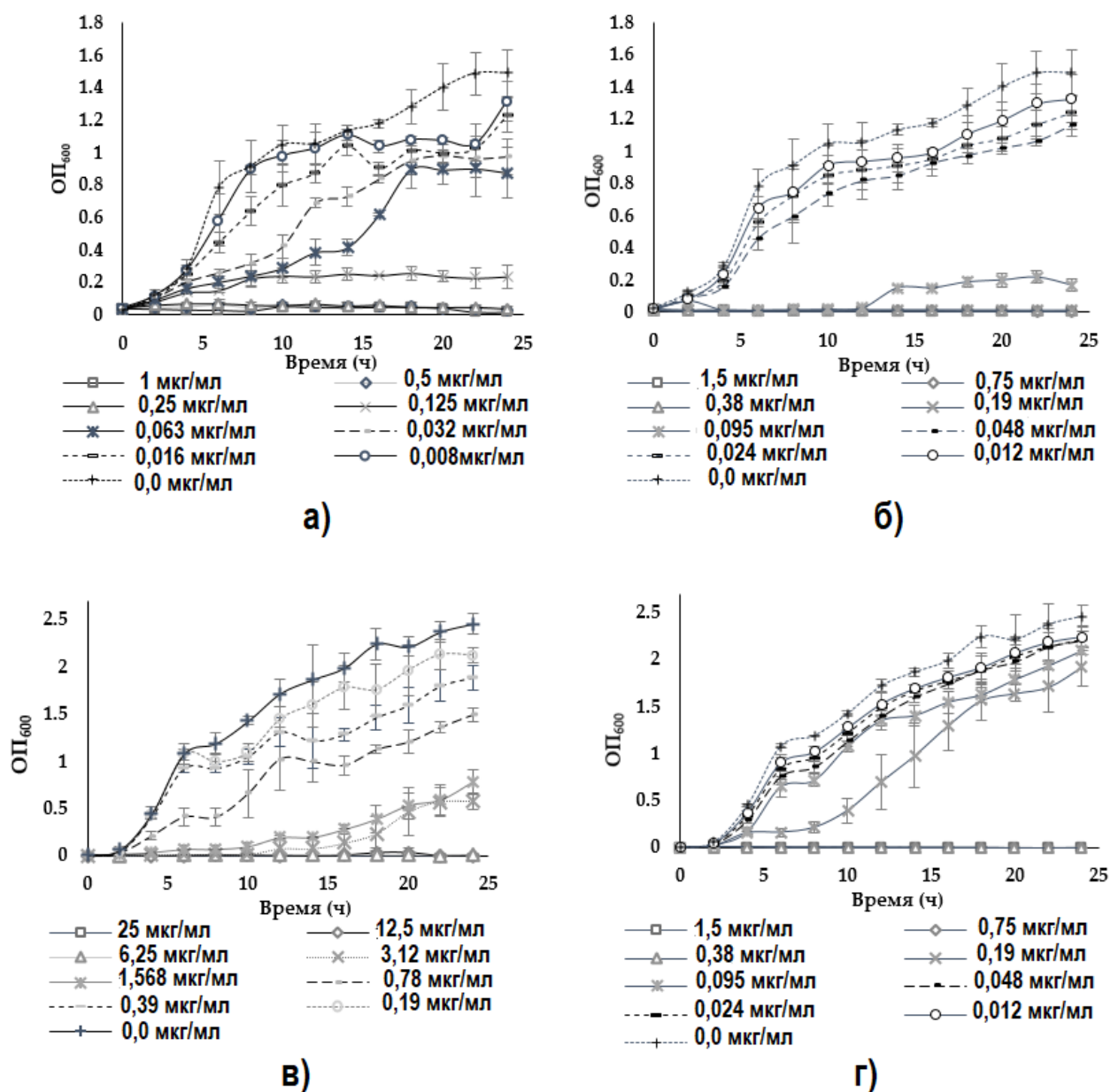


Рисунок 17. Кривые роста (а, б) *A. hydrophila* и (в, г) *A. salmonicida*, обработанные различными концентрациями либо КВМЭЗ, либо Док. Каждая точка данных представляет собой среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение от среднего (SD).

Эти результаты демонстрируют, что КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ может предотвращать и устойчиво ингибировать размножение и рост патогенов рыбы, включая устойчивый к антибиотикам штамм *A. salmonicida*, уже через 6 ч инкубации, что потенциально может быть использовано в качестве антибактериального средства. В нескольких исследованиях было установлено, что рост *Aeromonas* spp. ингибируется производными липидов и другими природными активными соединениями [293–295].

4.7. ГХ-МС-анализ последовательных экстрактов из жира ЛМЧЛ

Три последовательных экстракта КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3 анализировали с использованием прибора ГХ-МС, где аликвоту 50 мкл при концентрации 10 мг/мл каждого экстракта анализировали отдельно. Анализ ГХ-МС выявил 28-33 органических соединения в остатках жира личинок, как указано в таблице 10, таблице S1, таблице S2 и таблице S3. Химический профиль этих соединений был определен на основе базы данных Национального института стандартов и технологий (NIST, Гейтерсбург, Мэриленд, США). После сравнения масс-спектра неизвестных компонентов КВМЭ с диапазоном известных химических веществ из библиотеки NIST сходство спектров ГХ-МС более чем на 70% рассматривалось в качестве основного критерия для этого выбора.

Таблица 10. Основные соединения различных ПО жира ЛМЧЛ, обнаруженные методом ГХ-МС

Общее название		Химическая структура	C:D	КВМЭ1		КВМЭ2		КВМЭ3	
				Площадь пика %	Индекс сходства (SI) %	Площадь пика, %	Индекс сходства (SI) %	Площадь пика, %	Индекс сходства (SI) %
НЖК	Пальмитиновая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0	26,19	96	22,01	96	21,76	96
	Лауриновая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0	19,32	97	16,68	97	17,66	97
	Миристиновая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14:0	6,62	97	5,56	97	5,27	97
	Стеариновая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0	5,93	93	5,74	94	5,82	94

	Арахидоновая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20:0	0,34	88	0,46	91	0,31	90
	Каприновая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	10:0	0,31	89	0,26	86	0,3	84
	Пентадециловая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	15:0	0,3	86	0,2	94	0,2	91
	Тридециловая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	13:0	0,19	83	0,18	87	НО	НО
ненЖК	цис-олеиновая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{C}$ $\text{H}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1	22,65	95	23,9	95	26,28	95
	Пальмитолеиновая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{C}$ $\text{H}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16:1	3,03	96	3,05	96	3,15	96
	Линолевая кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{C}$ $\text{HCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2	0,37	91	0,21	89	0,21	91
	9 - Октадекадиеновая кислота (Z)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{C}$ $\text{H}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	17:1	НО	НО	0,26	88	НО	НО
ЖК Производные	Глицерин)	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	-	НО	НО	3,47	95	7,87	96
	9,12-Гексадекадиеновая кислота, метиловый эфир	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{C}$ $\text{HCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO-CH}_3$	-	НО	НО	НО	НО	0,25	78
	Цис-9-Гексадеценал	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{C}$ $\text{H}(\text{CH}_2)_7\text{CHO}$	-	НО	НО	НО	НО	0,13	83
	2,4-Додекадиенал, (E,E)-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{C}$ $\text{HCH}=\text{CH CHO}$	-	НО	НО	НО	НО	0,13	80

Бета- моноглицерин лауриновой кислоты	$C_{15}H_{30}O_4$	-	НО	НО	НО	НО	1,08	82
Оксиран- ундекановая кислота, 3-пентил-, метиловый эфир, цис-	$C_{19}H_{36}O_3$	-	НО	НО	НО	НО	1,14	85

Обозначения. НЖК: насыщенные жирные кислоты; неНЖК: ненасыщенные жирные кислоты; НО: не обнаружено; SI%: Процент сходства для обнаруженных соединений на основе библиотеки NIST-8.C: D, где C - количество атомов углерода, а D - количество двойных связей в углеродной цепи.

Хроматограмма ГХ-МС трех последовательных экстрактов (ПЭ) жира ЛМЧЛ показала небольшое различие в его составе (рисунок 18, рисунок S4, рисунок S5 и рисунок S6).

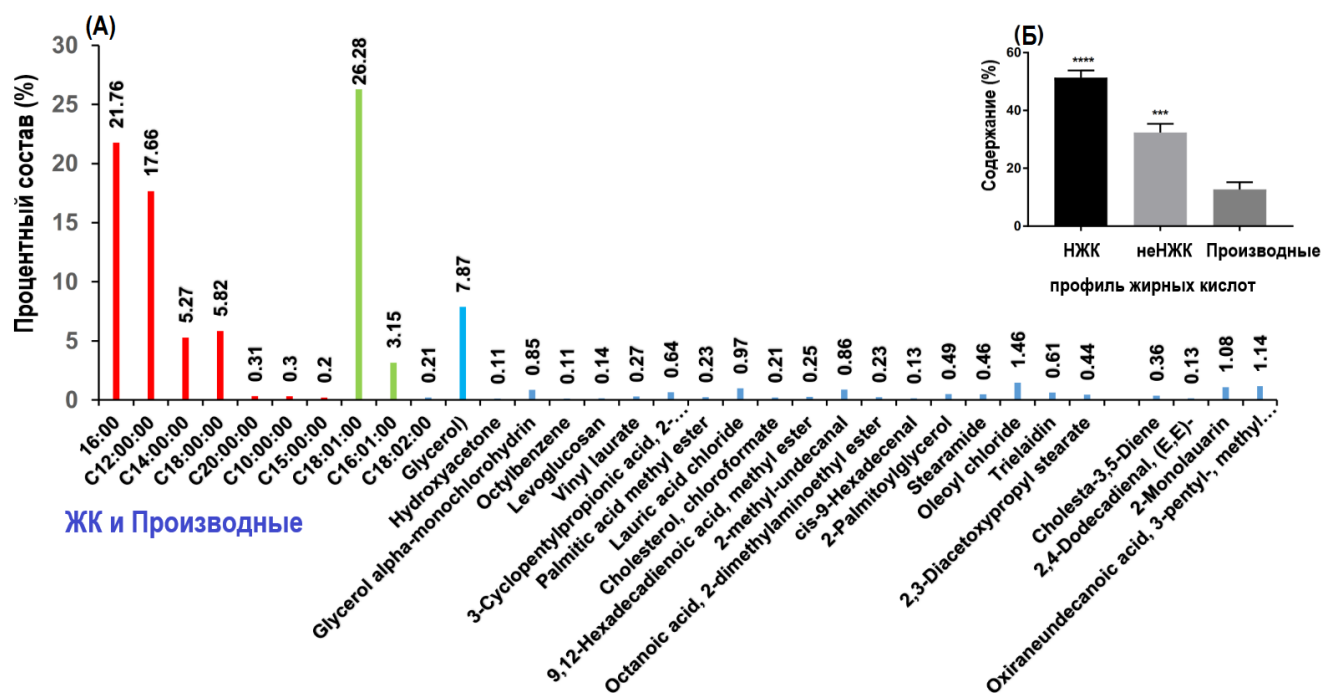


Рисунок 18. Композиция КВМЭ3, экстрагированная из жира личинок *H. illucens* в оптимальных условиях. (А) Процентное содержание и идентификация химических соединений КВМЭ3, обнаруженных с помощью анализа ГХ-МС с использованием библиотеки NIST-08; (Б) Профиль ЖК, включающий НЖК, неНЖК и производные ЖК, статистически проанализированный (**** $p < 0,0001$) с помощью одностороннего ANOVA.

Данные ГХ-МС показали, что первый экстракт КВМЭ1 содержал 28 пиков, в то время как второй КВМЭ2 и третий КВМЭ3 содержали 31 и 33 пика, соответственно. Пики были идентифицированы путем сравнения масс-спектров с базой данных библиотеки NIST-8 (рисунки S4-S6).

Химическая структура, время удерживания, молекулярная формула, молекулярная масса и концентрация (% площади пика) представлены на рисунках S4-S6, соответственно. Анализ ГХ-МС показал значительное содержание свободных жирных кислот (СЖК) и их производных в каждом ПЭ жира личинок *H. illucens*. Среди СЖК содержание насыщенных жирных кислот (НЖК) доминирует в два раза по концентрации, по сравнению с ненасыщенными жирными кислотами (неНЖК). Содержание НЖК в КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3 составило 59,2%, 51,09% и 51,32%, в то время как неНЖК составляло 26,05%, 27,42% и 29,64%, соответственно (таблица 10). Основными жирными кислотами были п-гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота), октадек-9-аноевая кислота (олеиновая кислота), додекановая кислота (стеариновая кислота),

тетрадекановая кислота (миристиновая кислота) и октадекановая кислота (стеариновая кислота). КВМЭЗ как наиболее мощное антибактериальное средство для подавления патогенных рыбных бактерий был обогащен цис-олеиновой кислотой (С18:1, 26,28%) и глицерином (С3:0,7, 87%) по сравнению с другими ПЭ. КВМЭЗ содержит несколько соединений с одной или более цис-двойными связями, таких как цис-олеиновая кислота; метиловый эфир 9,12-гексадекадиеновой кислоты; цис-9-гексадеценаль; 2,4-додекадиеналь, (Е, Е); бета-моноглицерид лауриновой кислоты; оксиранундекановая кислота, 3-пентилметиловый эфир, цис- не были обнаружены в КВМЭ1 и КВМЭ2 (таблица 10). Результаты ГХ-МС показали, что КВМЭЗ содержит наибольшее количество неНЖК, соединений с цис-двойными связями, а глицерин считается наиболее мощным антибактериальным средством среди других компонентов ПЭ, извлеченных из жира ЛМЧЛ.

Состав липидов варьируется в зависимости от способа обработки личинок, что может привести к различным профилям жирных кислот (ЖК) [31,37]. В попытке улучшить способ экстракции при переработке личинок, в настоящем исследовании мы осуществили три последовательных экстракции, получив экстракты КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ. Остаточное масло жировой биомассы личинок после каждой экстракции подвергали последующей экстракции в тех же условиях, что и первичный экстракт. Эта процедура, возможно, усилила гидролиз и кристаллизацию, что привело к выделению значительного количества неНЖК, наблюдаемого в КВМЭЗ.

Последовательная экстракция (ПЭ) в основном основана на полярности и кислотности, используемых для удаления полярных нефенольных соединений, таких как сахара и органические кислоты. В настоящем исследовании мы использовали один и тот же реагент для экстракции, и в ПЭ было обнаружено значительное изменение в содержании и составе ЖК. Кроме того, последовательная экстракция позволяет получать продукты с более высокой чистотой и - большей активностью [296]. Mai *et al.* (2019) [297] определили содержание ЖК в сыром и рафинированном масле, полученном из ЛМЧЛ, отметив, что произошло значительное изменение в содержании ЖК, где процентное содержание ЖК, таких как пальмитолеиновая (16:1), олеиновая (18:1), увеличилось больше в рафинированном, чем в сыром масле, и это соответствовало нашему исследованию.

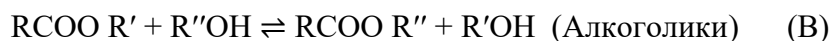
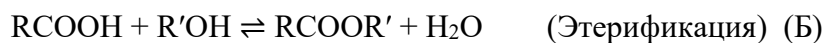
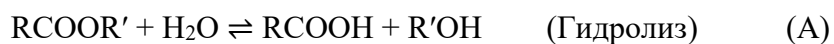
Характерный профиль жирных кислот из жира личинок *H. illucens* представлен в таблице 10. В нашей новой последовательной экстракции наиболее распространенным неНЖК была цис-олеиновая кислота (С18:1 n-9), составляющая 22,65-26,28% от общего количества жирных кислот, за которой следует 3,03-3,15% пальмитолеиновой кислоты (16:1), эти результаты соответствуют 18,24% и 2,36% соответственно, полученные Rabani *et al.* (2019) [298], которые использовали трудновоспроизводимый метод экстракции, основанный на запатентованном

биологическом разлагателе и 5% уксусной кислоте (для регулирования pH до 6), для отделения липидов личинок *H. illucens* без прессования или нагревания. Напротив, наша процедура экстракции значительно обогатила НЖК, ведущую группу жирных кислот во всех ПЭ (таблица 10), включая наиболее распространенную (21,76-26,19%) пальмитиновую (C16:0) и 5,82-5,93% стеариновую (C18:0) кислоту против 16,27% и 1,43% [298], соответственно. Хотя наша процедура позволила выделить меньше лауриновой кислоты (C12:0) - 17,66-19,32% против 40,79%. Наши результаты также подтвердили ранее полученные результаты [18,32,33,258]. Ewald *et al.* [257] сообщили о более высоком процентном содержании (3-13%) линолевой кислоты (C18:2) по сравнению с <1%, обнаруженным в нашей ПЭ. Несмотря на то, что КВМЭ1 содержит самый высокий процент НЖК, его антибактериальная активность была самой низкой среди других экстрактов в отношении штаммов патогенных бактерий рыбы.

В ходе нашего исследования были выделены и охарактеризованы в КВМЭ3 новые потенциально биологически активные молекулы: 9,12-гексадекадиеновая кислота, метиловый эфир - 0,25%; цис-9-гексадеценал - 0,13%; 2,4-додекадиенал, (Е, Е) -0,13%; бета-моноглицерид лауриновой кислоты - 1,08% и цис-оксиранундекановая кислота, 3-пентил-,метиловый эфир - 1,14% (рисунок 18). Хотя выход экстракта постепенно снижался с 60 до 30 мг в КВМЭ3, количество неНЖК, в частности цис-олеиновой кислоты (18:1), увеличилось с 22,65% в первом до 26,28% в третьем ПЭ (таблица 10). Эти результаты согласуются с данными Imbimbo *et al.* [299], которые экстрагировали 2,5% и 34% полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) из сырой биомассы *Galdieria phlegrean* и остаточной биомассы, соответственно. Следует отметить, что процентное содержание глицерина постепенно увеличивалось с 0% (КВМЭ1) до 7,87% (КВМЭ3), в то время как Ushakova *et al.* (2016) [45] обнаружили следы (0,36%) глицерина в масле личинок *H. illucens*.

Возможно, было бы полезно понять химические реакции, которые происходят в результате этих процессов с жиром личинок *H. illucens*. Физические и химические свойства липидов зависят от состава их жирных кислот, длины и степени насыщения углеродной цепи, а также их температуры плавления. Термический гидролиз происходит в основном в масляной фазе, а не на границе раздела вода-масло. Гидролиз более желателен в масле с короткими НЖК, такими как цис-9-гексадеценная кислота, октадек-9-еновая кислота (цис-олеиновая), чем в масле с длинными НЖК, такими как стеариновая, миристиновая и лауриновая кислоты, поскольку короткие НЖК более растворимы в воде, чем длинные насыщенные жирные кислоты. Длительный контакт между маслом и водной фазой личиночного жира увеличивает гидролиз масла ЛМЧЛ. Кроме того, большое количество воды (90%) в нашем экстракционном реагенте может быстро увеличить гидролиз личиночного масла [300,301].

Существует три уравнения равновесия (А, Б, В), которые представляют последовательность химических реакций, которые происходят непрерывно во время обычного метода экстракции [67].



После обработки исходного сырья СЖК были выделены из жира ЛМЧЛ на нескольких стадиях, включая гидролиз, обработку ультразвуком и гомогенизацию в условиях медленного катализа соляной кислотой. Кроме того, кислотный катализ в воде способствовал реакции гидролиза при последовательной экстракции. Кроме того, несколько обработок во время последовательной экстракции личиночного жира привели к ограниченным изменениям, наблюдаемым в составе третьего экстракта по сравнению с другими ПЭ. неНЖК, представленные в различных наборах, представляли собой октадек-9-еновую кислоту (цис-олеиновую кислоту), 9, 12-октадекадиеновую кислоту (Z, Z) - (линолевую кислоту) и цис-9-гексадеценовую кислоту (пальмитолеиновую кислоту) (таблица 10).

Для выделения неНЖК из твердого жира мы использовали метанол для этерификации личиночного жира, который должен быть растворен в водной фазе при 52 °С с последующей полной экстракцией в течение 24 ч при комнатной температуре (20 °С). Снижение температуры привело к кристаллизации НЖК во время первого раунда экстракции с получением различных уровней ЖК. Часть НЖК также была гомогенизирована и соединена с водной фазой в зависимости от их температуры плавления путем гидролиза. Процесс кристаллизации был виден после хранения этих концентрированных ПЭ в холодильнике при 4 °С, где НЖК кристаллизовались на поверхности, в то время как неНЖК были растворимы в экстракционном растворе [67]. Эти неНЖК обладали антимикробной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий [271,279,302]. Кроме того, они были эффективны против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [55], где 9, 12-гексадекадиеновая кислота, метиловый эфир, цис-9-гексадеценал, 2,4-додекадиенал, (Е, Е)-, додекановая кислота, 2-гидрокси-1-(гидроксиметил) этиловый эфир (лауриновая, бета-кислота. - моноглицерид), оксиранундекановая кислота и цис- 3-пентил-, метиловый эфир, новые соединения ГХ-МС, обнаруженные в КВМЭЗ, как известно, обладают антимикробной активностью в отношении различных штаммов патогенных бактерий [110,303].

Наши данные свидетельствуют о том, что жирные кислоты, основные компоненты масел и жиров, могут быть частично этерифицированы до глицерина во время последовательной

экстракции. Действительно, КВМЭЗ был обогащен глицерином на 7,87% по сравнению с КВМЭ1 на 0% и КВМЭ2 на 3,47% (таблица 10). Большое количество глицерина, возможно, было результатом высокой скорости гидролиза оставшегося масла, когда скорость гидролиза увеличилась. Этерификация метанолом с использованием HCl в качестве катализатора обеспечивает больший доступ метанолу и кислоте для гидролиза остаточного масла с получением глицерина в качестве побочного продукта наряду с СЖК. Кроме того, остаточная биомасса личиночного жира находилась в жидком состоянии, способствуя гидролизу во втором и третьем циклах экстракции [304]. Глицерин испаряется при 150 °С, в то время как ПЭ концентрируются в вакууме при 45 °С. Гидролиз проводили три цикла в течение ПЭ для одной и той же биомассы, что приводило к накоплению глицерина в масляной фазе и стимулированию образования мононенасыщенных жирных кислот путем гидролиза, о котором сообщалось ранее [305]. Ди- и моноацилглицерины, глицерин и жирные кислоты, присутствующие в масляной фазе, ускоряют дальнейшую реакцию гидролиза масла [306]. Позиционные и геометрические изомеры, преимущественно представленные в СЖК в форме цис-изомеров в природных липидах, способствуют решающей роли СЖК в уничтожении микробов. Насыщенные кислородом функциональные группы встречающихся в природе жирных кислот включают гидроксильные, кето- и эпоксидные группы. Гидроксизамещенные кислоты чаще всего встречаются в большом количестве в СЖК. Олеиновая кислота является наиболее распространенной и является предметом торговли и компонентом всех пищевых жиров, а также антибактериальной, эффективной против патогенных бактерий [10]. Примечательно, что наша усовершенствованная процедура экстракции позволила значительно обогатить этот ценный компонент в КВМЭЗ (таблица 10) по сравнению с другими опубликованными методами экстракции жира личинок НІ.

Животноводство и рыбоводство страдают от инфекционных заболеваний, в основном связанных с бактериями *Aeromonas* spp, которые были связаны со смертностью в диапазоне от 50% до 100% в производственных системах аквакультуры. Поэтому антибактериальные свойства полученных ПЭ были определены с помощью нескольких анализов против патогенных рыбных бактерий. Наши данные показали, что активность ПЭ из жира ЛМЧЛ резко возросла из-за этих последовательных экстракций. КВМЭЗ оказался наиболее активным среди различных ПЭ, полученных при исследовании одной и той же биомассы жира ЛМЧЛ. Кроме того, *A. hydrophila* и *A. salmonicida* были подавлены и уничтожены низкой дозой КВМЭЗ. Активность трех смешанных ПЭ была меньше, чем только у КВМЭЗ. Мы подозреваем, что КВМЭЗ обладал самой высокой антибактериальной активностью в отношении тестируемых штаммов из-за высокого количества олеиновой кислоты (26,28%), но не из-за глицерина (7,87%), хотя сообщалось об антимикробной активности последнего [272]. Мы протестировали ту же пропорцию чистого глицерина (7,87%) путем смешивания с КВМЭ1 в асептических условиях, чтобы получить

конечную концентрацию 40 мг/мл смеси глицерина и КВМЭ1. Полученное значение ДЗИ смеси глицерина и КВМЭ1 существенно не отличалось от одного только КВМЭ1 против патогенных рыбных бактерий, где эффективность глицерина проявлялась через 48 или 72 часа. Этот результат подтверждает исследование Saegeman *et al.* [307], в котором сообщалось, что только более высокие концентрации глицерина (85%) и более высокие температуры инкубации оказывали длительное антимикробное действие и вирулицидную активность на несколько типов вирусов. Кроме того, в нескольких исследованиях обсуждалось влияние глицерина на ингибирование роста бактерий как бактериостатического или усиливающего рост и антимикробные свойства отдельных бактерий *Vibrio* [308,309]. С другой стороны, молекулы глицерина вступают в реакцию с жирными кислотами, такими как лауриновая кислота, и образуют монолаурат глицерина (ГМЛ). В нашем исследовании КВМЭ3 содержит 32,12% соединений с одной или несколькими цис-двойными связями, которые, как было доказано, повышают антибактериальную активность жирных кислот и их производных, как сообщили Yoon *et al.* [95].

Глава 5. Влияние экстракта жира личинок *H. illucens* КВМЭЗ на ШЛУ и МЛУ патогенные бактерии человека и эукариотические клетки ЭПЧ-293

5.1. Оценка МЛУ штаммов *Klebsiella pneumoniae* человека

Феномен устойчивости к антибиотикам представляет собой одну из наиболее острых проблем общественного здравоохранения, а гены устойчивости к антибиотикам считаются новым загрязнителем окружающей среды [310]. Метод дисковой диффузии использовали для определения влияния чувствительности к противомикробному КВМЭЗ на три бактериальных штамма: *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* КРi1627. Значения ДЗИ интерпретировались нами в сравнении со значениями *Escherichia coli*, поскольку в рекомендациях CLSI нет контрольных точек для *K. pneumoniae*. Контрольные точки *E. coli* рекомендуются и используются для других энтеробактерий, таких как виды *Klebsiella* [311]. Для оценки восприимчивости трех протестированных штаммов *K. pneumoniae* ДЗИ измеряли с помощью дискового анализа, а значения МПК, МБК определяли методом титрования (таблицы 11-12, рисунок S7), который рекомендован CLSI, 2018 [235]. *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 показал устойчивость к двенадцати, в то время как *K. pneumoniae* КРi1627 и *K. pneumoniae* КРМ9 были устойчивы только к шести из четырнадцати протестированных противомикробных препаратов.

Таблица 11. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae* человека

Антибиотики	ДЗИ (мм)						Контрольные значения		
	КР ATCC ВАА-2473		КРi 1627		КРМ9		Р	П	Ч
	12 ч	24 ч	12 ч	12 ч	12 ч	24 ч			
Г	0,0 (Р)	0,0 (Р)	16,55±2,36 (Ч)	16,1±0,2 (Ч)	16,93±1,18 (Ч)	16,72±2 (Ч)	≤12	13-14	≥15
Хл	10,27±0,07 (Р)	9,92±1 (Р)	21,55±0,19 (Ч)	21,7±1,9 (Ч)	18,33±2,1 (Ч)	18,15±1,6 (Ч)	≤12	13-17	≥18
К	11,1±0,72 (Р)	10,87±0,27 (Р)	21,33±0,47 (Ч)	22,36±1,84 (Ч)	22,36±1,84 (Ч)	20,7±1,6 (Ч)	≤13	14-17	≥18
Док	18,48±2,3 (Ч)	18,1±1,2 (Ч)	19,18±0,8 (Ч)	18,62±0,35 (Ч)	18,68±0,9 (Ч)	17,43±0,8 (Ч)	<10	11-13	≥14
П/С	0,0 (Р)	0,0 (Р)	14,7±0,42 (П)	14,45±0,44 (П)	15,56±0,37 (Ч)	14,88±0,23 (П)	≤11	12-14	≥15
КТ	11,6±0,14 (Ч)	11,35±0,49 (Ч)	8,2±0,38 (Р)	8,12±0,26 (Р)	9,74±0,76 (Р)	9,23±0,26 (Р)	≤10	-	≥11

РД	0,0 (P)	0,0 (P)	9,38±0,47 (P)	9 ±0,79 (P)	10,36±0,86 (P)	10,5±0,75 (P)	≤16	17-19	≥20
Э	9,5±1,13 (P)	10,1±1,5 (P)	9,97±0,71 (P)	9,9±0,75 (P)	10,57±0,53 (P)	10,35±0,41 (P)	≤13	14-22	≥23
ВА	0,0 (P)	0,0 (P)	0,0 (P)	0,0 (P)	0,0 (P)	0,0 (P)	-	-	≥15
П	0,0 (P)	0,0 (P)	0,0 (P)	0,0 (P)	0,0 (P)	0,0 (P)	≤28	-	≥29
Амп	0,0 (P)	0,0 (P)	12,08±0,7 (P)	11,62±0,44 (P)	12,48±0,44 (P)	11,78±0,6 (P)	≤13	14-16	≥17
Цеф	0,0 (P)	0,0 (P)	29,35±0,64 (Ч)	28,9±0,82 (Ч)	30,9±0,61 (Ч)	30,48±0,56 (Ч)	≤18	-	≥25
Цеп	0,0 (P)	0,0 (P)	29,23±0,85 (Ч)	28,85±0,39 (Ч)	30,53±0,33 (Ч)	29,95±0,24 (Ч)	≤15	16-20	≥21
Лев	0,0 (P)	0,0 (P)	29,1±0,57 (Ч)	28,87±0,66 (Ч)	29,33±0,4 (Ч)	29±0,33 (Ч)	≤13	14-16	≥17

Обозначения: Г, гентамицин; Хл, хлорамфеникол; К, канамицин; Док, доксициклин; П/С, пенициллин-стрептомицин; КТ, колистин; РД, рифампицин; Э, эритромицин; ВА, ванкомицин; П, пенициллин; Амп, Ампициллин; Цеф, цефипим; Цеп, ципрофлоксацин; Лев, левоти록син Р, резистентный; П, промежуточный; Ч, чувствительный; (0), означает отсутствие зоны торможения вокруг диска на пластине; (-), не определено.

Таблица 12. МПК, МБК и соотношение МБК/МПК различных антибиотиков против патогенных штаммов *K. pneumoniae* человека

Антибиотики	<i>K. pneumoniae</i> KPi1627			<i>K. pneumoniae</i> KPM9			<i>K. pneumoniae</i> ATCC- 2473			Контрольные значения (мкг/мл), рекомендованная CLSI		
	МПК	МБК	МБК/ МПК	МПК	МБК	МБК/ МПК	МПК	МБК	МБК/ МПК	Р	П	Ч
Г	2,25 (Ч)	2,25	1	1,56 (Ч)	3,12	2	≥1250 (P)	≥1250	-	≤4	8	≥16
Хл	6,25 (Ч)	25	4	6,25 (Ч)	50	8	39 (P)	156	4	≤8	16	≥32
К	12,5 (Ч)	25	2	12,5 (Ч)	12,5	1	≥1250 (P)	≥1250	-	≤16	32	64
Док	1,56 (Ч)	6,25	4	3,12 (Ч)	12,5	4	6,25 (П)	50	8	≤4	8	≥16
П/С	9,77 (Ч)	9,77	1	9,77 (Ч)	9,77	1	≥1250 (P)	≥1250	-	-	-	-
КТ	≥1250 (P)	≥1250	-	11,33 (P)	11,33	1	0,39 (Ч)	1,56	4	≤2	-	≥4

РД	78 (P)	312,5	4	39 (P)	78	2	≥1250 (P)	≥1250	-	≤1	2	≥4
Э	625 (P)	625	1	625 (P)	1250	2	625 (P)	≥1250	-	≤0.5	1-4	≥8
П	312,5 (P)	312,5	1	625 (P)	625	1	≥1250 (P)	≥1250	-	≤0.12	-	≥0.25
Амп	156,25 (P)	625	4	156,25 (P)	312,5	2	≥1250 (P)	≥1250	-	≤8	16	≥32
Цеф	0,39 (Ч)	0,39	1	0,098 (Ч)	0,195	2	156 (P)	625	4	≤2	4	≥8
Цеп	0,39 (Ч)	0,39	1	0,39 (Ч)	0,39	1	156 (P)	312,5	2	≤1	2	≥4
Лев	1,56 (Ч)	6,25	4	0,08 (Ч)	0,08	1	25 (P)	100	4	≤2	-	≥16

Полученные значения сравнивались с значениями, рекомендованными CLSI.

Обозначения: Г, гентамицин; Хл, хлорамфеникол; К, канамицин; Док, доксициклин; П/С, пенициллин-стрептомицин; КТ, колистин; РД, рифампицин; Э, эритромицин; ВА, ванкомицин; П, пенициллин; Амп, Ампициллин; Цеф, цефипим; Цеп, ципрофлоксацин; Лев, левоти록син Р, резистентный; П, промежуточный; Ч, чувствительный; (0), означает отсутствие зоны торможения вокруг диска на пластине; (-), не определено.

Все штаммы *K. pneumoniae* продемонстрировали стабильную 100% устойчивость к пенициллину, ванкомицину, эритромицину и рифампицину в течение 12 ч и 24 ч инкубации. Все протестированные штаммы *K. pneumoniae*, выделенные из разных источников, проявляли высокую чувствительность к доксициклину (рисунок S7, таблица 11), что является обоснованием его использования в качестве положительного контроля в текущем исследовании. *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 был на 100% устойчив к гентамицину и пенициллину, при этом на 12 и 24 ч инкубации вокруг дисков не возникало ДЗИ, и обладал высокой устойчивостью к канамицину и хлорамфениколу, подтвержденной ДЗИ в анализе диффузии диска (рисунок S7). Более того, МПК, определенный с помощью анализа микродиллюции, показывает, что *K. pneumoniae* KPi1627 и *K. pneumoniae* KPM9 были устойчивы к шести противомикробным препаратам, относящимся к пяти классам, в то время как *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 проявлял самую высокую устойчивость по сравнению с двумя другими штаммами, где он был устойчив ко всем тестируемым антибиотикам, кроме двух категорий (колистин, доксициклин) (таблица 11). Следует отметить, что как внутрибольничный штамм KPi 1627 дикого типа, так и изолированный из окружающей среды штамм KPM9 были устойчивы к колистину, антибиотику последней инстанции, который широко активен в отношении грамотрицательных бактерий, несмотря на

наличие побочных эффектов, включая нефротоксичность и ототоксичность. В отличие от этого, *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 был чувствителен к этому антибиотику, но проявлял высокую устойчивость к группам фторхинолонов (ципрофлоксацин, левофлоксацин) и цефемов (цефепим). С другой стороны, *K. pneumoniae* КРi1627 и *K. pneumoniae* КРМ9 показали значительную чувствительность к тем же категориям антибиотиков (Цеп, Лев, Цеф) (таблица 11). На основании соотношения МБК/МПК все категории антибиотиков были классифицированы как бактерицидные или бактериостатические. Таким образом, если соотношение МБК/МПК ≥ 4 , бактерии должны были быть бактериостатическими, в то время как МБК/МПК ≤ 2 , бактерии были бактерицидными. В нашем исследовании хлорамфеникол, доксициклин, рифампицин, ампициллин и цефепим показали бактериостатическую активность в отношении *K. pneumoniae* КРi1627.

Антибактериальные агенты хлорамфеникол и доксициклин проявляли бактериостатические свойства в отношении штамма *K. pneumoniae* КРМ9, в то время как пять важных антибиотиков, включая хлорамфеникол, доксициклин, колистин, левофлоксацин и цефепим, обладали бактериостатическими свойствами в отношении *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 (таблица 12). Основываясь на наших результатах, колистин и доксициклин мы бы рекомендовали для лечения *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, в то время как гентамицин, канамицин, пенициллин-стрептомицин, цiproфлоксацин, левофлоксацин и цефепим мы бы рекомендовали для лечения обоих штаммов *K. pneumoniae* КРi1627 и *K. pneumoniae* КРМ9. Процент антибиотикоустойчивости *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, *K. pneumoniae* КРi1627 и *K. pneumoniae* КРМ9 к четырнадцати различным антибиотикам составил 83,33, 42,86 и 42,86 % соответственно. Следовательно, штаммы *K. pneumoniae* КРi1627 и *K. pneumoniae* КРМ9 были классифицированы как штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) на основании их устойчивости к двум или более антибиотикам, в то время как штаммы *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 был классифицирован как с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), поскольку он был устойчив ко всем антибиотикам, кроме двух категорий (доксициклин, колистин) из четырнадцати, использованных в нашем исследовании (таблица 13) [236].

Таблица 13. Структура устойчивости к противомикробным препаратам патогенных штаммов *K. pneumoniae* человека (n = 3)

Классы антибиотиков	Специфический антибиотик	Интерпретация					
		Увствительный		Промежуточный		Резистентность	
		<i>H</i>	%	<i>H</i>	%	<i>H</i>	%

	Гентамицин	2	66,7	-	-	1	33,3
Аминогликозиды	Канамицин	2	66,7	-	-	1	33,3
	Пенициллин- стрептомицин	2	66,7	-	-	1	33,3
	Ансамиды	Рифампицин	-	-	-	-	3
Гликопептиды	Ванкомицин	-	-	-	-	3	100
Макролиды	Эритромицин	-	-	-	-	3	100
Тетрациклины	Доксициклин	2	66,7	1	33,3	-	-
Фторхинолоны	Ципрофлоксацин	2	66,7	-	-	1	33,3
	Левифлоксацин	2	66,7	-	-	1	33,3
Фениколы	Хлорамфеникол	2	66,7	-	-	1	33,3
Пенициллины	Пенициллин	-	-	-	-	3	100
	Ампициллин	-	-	-	-	3	100
Липопептиды	Колистин	1	33,3			2	66,7
Цефемы	Цефепим	2	66,7	-	-	1	33,3
	Значение <i>P</i>		<i>P</i> < 0,0001		<i>P</i> < 0,0001		<i>P</i> < 0,0001

K. pneumoniae обладает повышенной устойчивостью к различным антибиотикам, особенно к штаммам с ферментами карбапенема, которые являются высоковирулентными и приобретают устойчивость к нескольким антибиотикам, что приводит к высокой смертности у пациентов с ослабленным иммунитетом [311]. Штаммы *K. pneumoniae* KPM9 и KPi1627 имеют гены на обеих хромосомах и плазмиде, связанные с вирулентностью и устойчивостью к антибактериальным препаратам, идентифицированные в их геномы. Кроме того, эти гены ответственны за гипермуковязкость этих штаммов. *K. pneumoniae* KPi1627 и *K. pneumoniae* KPM9 имеет капсиды K1 и K20, ответственные за вирулентность и патогенность [233]. МЛУ может передаваться бактериям посредством генетической мутации и горизонтального переноса генов через хромосомы, плазмиды, транспозоны и другие мобильные генетические элементы [312]. В текущем исследовании высокий уровень резистентности к хинолонам (левофлоксацину, ципрофлоксацину) был очевиден среди *K. pneumoniae* (33,3%), где у *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 МПК был равен 156 мкг/мл, в то время как значения МБК, вызванные левофлоксацином, ципрофлоксацином, составляли 625 мкг/мл и 312,5 мкг/мл, соответственно. Устойчивость к фторхинолоновым группам среди штаммов *K. pneumoniae* в основном обусловлена мутациями, нацеленными на области, определяющие устойчивость к хинолонам (англ. QRDR) *gyrA*, и *parC* ДНК-гиразы и топоизомеразы [313]. Таким образом, существует настоятельная необходимость в новых методах лечения, нацеленных на МЛУ-микробы [314]. Поскольку показатели

резистентности продолжают расти, новые подходы к противомикробной терапии МЛУ-бактерий, включая устойчивые к карбапенему энтеробактерий, будут приобретать все большее значение. Хотя доксицилин и колистин признаны наиболее сильнодействующими среди других 14 антибиотиков, но у них есть значительные клинические недостатки, такие как токсические побочные эффекты, вызываемые колистином, и плохое распределение тигецилина в определенных важных участках тела, включая кровь и мочу. Даже новые препараты, такие как цефтазидим-авибактам, уязвимы к возникновению резистентности [315]. Аминогликозиды, такие как стрептомицин и гентамицин, часто используются в комбинации с пенициллином для лечения тяжелых внутрибольничных инфекций. Подобно аминогликозидам, амфениколы, такие как хлорамфеникол, ингибируют синтез белка [316]. Устойчивость *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, вызванная несколькими антибиотиками в течение вторых 12 часов инкубационного периода в настоящем исследовании, развилась из-за экспрессии бета-лактамаз расширенного спектра действия (англ. ESBLs) или Нью-Дели Металло-бета-лактамазы 1 (англ. NDM) [317].

5.2. Антибактериальная активность КВМЭЗ в отношении штаммов *K. pneumoniae*

Различные концентрации КВМЭЗ были протестированы против штаммов *K. pneumoniae* с использованием дискового диффузионного анализа для оценки антибактериальной активности. Все протестированные штаммы грамотрицательных бактерий обрабатывали КВМЭЗ с концентрациями 1,25, 2,5, 5, 10, 20 мг/мл, которые загружали по 50 мкл на диски диаметром 6 мм. ДЗИ определяли путем измерения ореолов ингибирования, индуцированных КВМЭЗ вокруг дисков, через 12 ч и 24 ч инкубационного времени (таблица 14, рисунок 19). Впервые активность экстракта КВМЭЗ была оценена в отношении клинических и экологических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, включая штаммы *K. pneumoniae* КРi1627 и *K. pneumoniae* КРМ9, соответственно, по сравнению со стандартным штаммом *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473.

Таблица 14. Диаметры зон ингибирования (ДЗИ), вызванные КВМЭЗ жира личинок *H. illucens* против штаммов *K. Pneumoniae*

КВМЭЗ (мг/мл)	ДЗИ (мм)					
	КР ATCC ВАА-2473		КРМ9		КРi1627	
	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч
20	22,8±0,47	19,72±0,51	18,7±0,52	16,52±0,74	14,83±0,49	14,23±0,35
10	14,7±0,26	13,88±0,35	13,6±0,56	12,98±0,39	11,6±0,34	10,5±0,37
5	12,73±0,21	10,78±0,33	10,25±0,4	9,48±0,28	9,43±0,24	8,67±0,24

2,5	11,17±0,24	9,25±0,54	8,1±0,33	7,67±0,25	7,45±0,32	7,18±0,19
1,25	8,9±0,45	8,06±0,52	7,15±0,27	6,63±0,2	6,86±0,19	6,5±0,23
П.К (Док)	18,48±2,3	18,1±1,2	19,18±0,8	18,62±0,35	18,68±0,9	17,43±0,8
О.К	НО	НО	НО	НО	НО	НО

Обозначения. НО: не определено; О.К: отрицательный контроль, П.К (Док): положительный контроль (доксициклин) в концентрации 600 мкг/мл (30 мкг/диск).

Время	(a) <i>K. pneumoniae</i> KPi1627		
12 ч	(A)	(Б)	(B)
24 ч	(б) <i>K. pneumoniae</i> KPi1627		
	(A)	(Б)	(B)
12 ч	(в) <i>K. pneumoniae</i> KPM9		
	(A)	(Б)	(B)
24 ч	(г) <i>K. pneumoniae</i> KPM9		
	(A)	(Б)	(B)

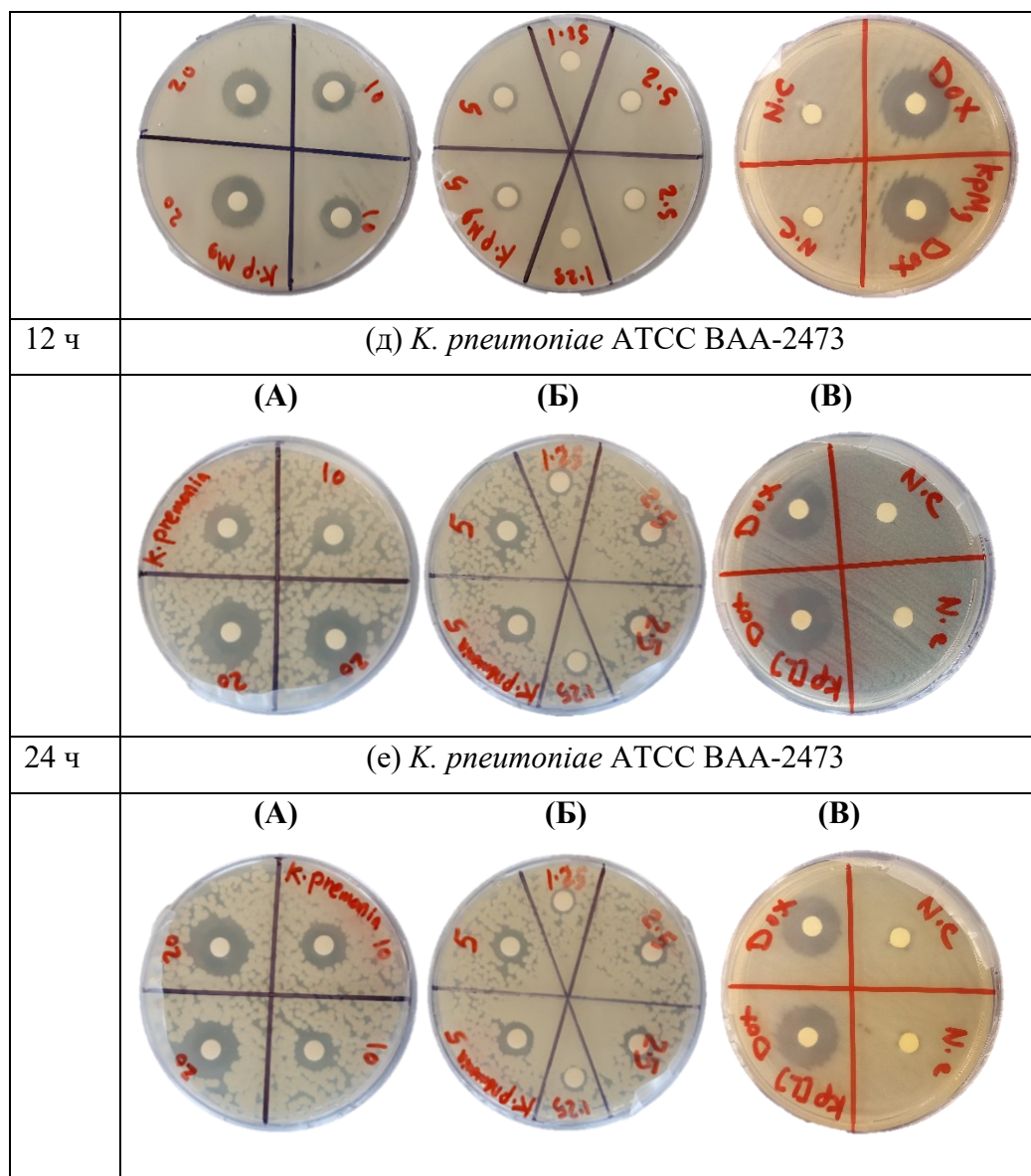


Рисунок 19. Анализ зоны ингибирования для тестируемых штаммов бактерий. Диаметры зон ингибирования измеряли после 12 ч и 24 ч ночной инкубации дисков, загруженных в чашки Петри с агаром, засеянным (а, б) *K. pneumoniae* КРi1627; (в, г) *K. pneumoniae* КРМ9; и (д, е) штаммами *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 с суспензией 5×10^8 КОЕ/мл; (А). Диски загружали 50 мкл КВМЭЗ из жира личинок с концентрациями 10 и 20 мг/мл; (Б) 50 мкл КВМЭЗ загружали с концентрацией 1,25, 2,5 и 5 мг/мл; (В) 50 мкл Док с концентрацией 600 мкг/мл (30 мкг/диск) использовали в качестве положительного контроля, а 50 мкл чистого реагента для извлечения КВМ использовали в качестве отрицательного контроля (О.К). Все образцы были загружены в дубликатах.

Результаты ANOVA показали значительную разницу между средними ореолами ингибирования, полученными при обработке различных штаммов патогенных бактерий человека КВМЭЗ, по сравнению с ДЗИ, вызванным эталонным антибиотиком (Док) ($p \leq 0,05$). Наиболее значительный размер зоны ингибирования принадлежит *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 и *K.*

pneumoniae КРМ9, что указывает на их наибольшую восприимчивость к КВМЭЗ, полученному из натурального жира личинок *H. illucens*. Их значения ДЗИ составили $19,72 \pm 0,51$ мм и $16,52 \pm 0,74$ мм, соответственно, при обработке 20 мг/мл в течение 24 ч инкубации, по сравнению с положительным контролем (Док) $18,1 \pm 1,2$ мм и $18,62 \pm 0,35$ мм, соответственно. Штамм *K. pneumoniae* КРi1627 был наименее восприимчив, и зарегистрирована значительная разница ($****p < 0,0001$) по сравнению с контрольным контролем через 12 ч и 24 ч инкубационного времени (рисунок 20). Наши результаты показывают, что все эти штаммы МЛЮ, выделенные из разных источников, могут быть ингибированы КВМЭЗ дозозависимым образом. Более того, все протестированные *K. pneumoniae* уничтожались при концентрации КВМЭЗ 20 мг/мл. Несколько исследований новых противомикробных средств привели к тому, что ЖК стали рассматривать в качестве альтернативного препарата для борьбы с бактериями МЛЮ. Антибактериальные свойства ЖК известны уже давно. Растения, водоросли и животные продуцируют ЖК для защиты от патогенов, включая бактерии с множественной лекарственной устойчивостью [318,319]. Наши предыдущие исследования показали, что ЖК, последовательно экстрагированные из личинок *H. illucens*, обладают значительной антимикробной активностью в отношении МЛЮ *Aeromonas* spp. и фитопатогенных штаммов бактерий [31,72]. Экстракт КВМЭЗ, выделенный путем последовательной экстракции из жира личинок *H. illucens*, проявлял высокую активность по сравнению с маслом *H. illucens*, при этом ДЗИ составил $9,60 \pm 2,75$ мм против *S. aureus*, определенного другими, дополнительный метанольный экстракт личинок *H. illucens* вызывал ДЗИ в диапазоне 7-9 мм против *K. pneumoniae* при 20 мг/мл [320].

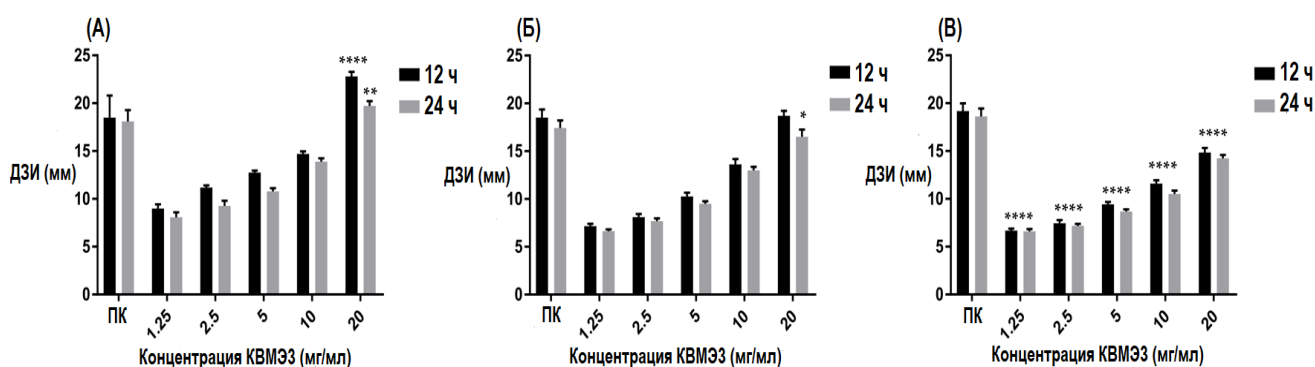


Рисунок 20. Чувствительность КВМЭЗ к противомикробным препаратам против (А) штаммов *K. pneumoniae* ATCC VAA-2473, (Б) штаммов *K. pneumoniae* КРМ9 и (В) штаммов *K. pneumoniae* КРi1627. Штаммы бактерий подвергали воздействию концентраций 1,25, 2,5, 5, 10 и 20 мг/мл КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ. Значения ДЗИ измеряли через 12 ч и 24 ч инкубации при 37 °С. Доксициклин (Док) используется в качестве положительного антибактериального контроля. Все значения представлены в виде среднего \pm SD в трех повторах ($n = 3$). Данные были проанализированы с помощью двустороннего ANOVA с последующим тестом Даннетта. Данные представляли собой значимую разницу по сравнению с положительным контролем, а значение p варьировалось от $*p = 0,0138$ до $****p < 0,0001$.

В таблице 18 приведены МПК КВМЭЗ для всех протестированных штаммов бактерий, полученных после 24 ч инкубации. КВМЭЗ ингибировал рост *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* КРi1627 при концентрации МПК 250 мкг/мл. Доксциклин (положительный контроль) ингибировал рост бактерий *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 при МПК 6,25 мкг/мл, в то время как ингибирование роста *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* КРi1627 было получено при МПК 3,12 мкг/мл и 1,56 мкг/мл соответственно. Все тестируемые штаммы обрабатывали различными концентрациями положительного контроля в диапазоне 0,195-50 мкг/мл. МБК определяется как самая низкая концентрация, убивающая 99,99% протестированных штаммов бактерий после 48 часов инкубации. КВМЭЗ продемонстрировал равный МБК 250 мкг/мл для всех протестированных патогенов *K. pneumoniae* человека. Напротив, МБК 50 мкг/мл для доксициклина был самым высоким для штамма *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, по сравнению с МБК 12,5 мкг/мл для *K. pneumoniae* КРМ9 и МБК 6,25 мкг/мл для изолятов *K. pneumoniae* КРi1627. Соотношение МБК /МПК не превышало 2 для КВМЭЗ, в то время как колебалось от 4 до 8 для положительного контроля (Док). Эти результаты продемонстрировали, что КВМЭЗ обладает устойчивой бактерицидной активностью, сравнимой с контрольным эталонным антибиотиком (Док), который проявлял бактериостатическую активность против всех протестированных штаммов *K. pneumoniae*. Кроме того, МБК 250 мкг/мл КВМЭЗ был ниже, чем МБК девяти антибиотиков (гентамицин, пенициллин-стрептомицин, канамицин, рифампицин, эритромицин, пенициллин, ампициллин, левофлоксацин и ципрофлоксацин), используемых для тестирования против *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, где их МБК варьировался от 312,5 мкг/мл.МЛ до ≥ 1250 мкг/мл (таблица 12).

Таблица 15. Антибактериальная активность, измеренная с помощью МПК и МБК КВМЭЗ в отношении штаммов *K. Pneumoniae*

Антибактериальное средство	Активность	Концентрация (мкг/мл)		
		КР ATCC ВАА-2473	КРМ9	КРi 1627
КВМЭЗ	МПК	250	250	250
	МБК	250	250	250
	МБК/МПК (соотношение)	1.0	1.0	1.0
Положительный контроль (Док)	МПК	6.25	3.12	1.56
	МБК	50	12.5	6.25

МБК/МПК (соотношение)	8.0	4.0	4.0
--------------------------	-----	-----	-----

Несколько исследований новых противомикробных средств привели к тому, что ЖК стали рассматривать в качестве альтернативного препарата для борьбы с бактериями МЛЮ. Антибактериальные свойства ЖК известны уже давно. Растения, водоросли и животные продуцируют ЖК для защиты от патогенов, включая бактерии с множественной лекарственной устойчивостью [318,319]. Тем не менее, наши результаты были соизмеримы с результатами экстрактов метиловых эфиров жирных кислот мангрового дерева слепого глаза и липофильных экстрактов различных частей растения *Pistacia vera* [30,321]. Некоторые микроводоросли, такие как *Chlorella vulgaris*, *Planktochlorella nurekis* и *Ulva rigida*, продуцируют хлорелин, смесь ЖК, которые ингибируют клинические и неклинические бактерии МЛЮ [322–325]. El Shafay *et al.* [326] выделили и идентифицировали антибактериальные ЖК из экстрактов *Sargassum vulgare* и *Sargassum fusiforme*, которые убивают клинические изоляты МЛЮ *S. aureus* и *K. pneumoniae*. Гексановый экстракт *Halimeda discoidea*, который содержит ЖК, такие как пальмитиновая кислота, ингибирует *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 [327]. Эти данные соответствовали нашим результатам.

Олеиновая, линолевая, линоленовая кислоты обладают наиболее мощной антибактериальной активностью среди длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот (неНЖК). Напротив, длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты (НЖК), включая пальмитиновую и стеариновую кислоты, менее активны [135]. Жир личинок *H. illucens* содержит значительное количество неНЖК, особенно цис-олеиновой кислоты. Кроме того, масло *H. illucens* характеризуется преобладающим количеством лауриновой кислоты, жирной кислоты со средней длиной цепи, и обладает широким спектром активности против различных бактерий *in vitro* [94,115]. Matsue *et al.* [101] продемонстрировали, что сама по себе лауриновая кислота не ингибирует штамм *K. pneumoniae* ATCC4352 даже при 2,5 мм. Таким образом, комбинация ЖК усиливает активность КВМЭЗ для уничтожения штаммов МЛЮ *K. pneumoniae* при 250 мкг/мл. Woz'niak *et al.*, 2010 [328] экстрагировали ЖК из плодов *Peucedanum cervaria* и *P. alsaticum*, которые были менее активны против *K. pneumoniae* ATCC 13883 с МПК 0,5- 4 мг/мл, по сравнению с КВМЭЗ МПК 250 мкг/мл. Количество и качество жирных кислот, особенно в *H. illucens* личинки, могут отличаться в зависимости от стадии развития личинки и использования различных субстратов для выращивания [279]. Однако масло ЛМЧЛ всегда содержит большое количество лауриновой кислоты. Полиненасыщенные жирные кислоты и свободные жирные

кислоты также были идентифицированы как противомикробные препараты с широким спектром активности, на которые не влияют классические механизмы резистентности [96,329,330].

5.3. Определение значений МПК50 экстракта КВМЭЗ против штаммов *K. pneumoniae*

Значения МПК50 КВМЭЗ и положительный контроль против штаммов *K. pneumoniae* человека показаны в таблице 16 и на рисунок 21.

Таблица 16. Значения МПК50 КВМЭЗ и положительного контроля против штаммов *K. pneumoniae*, проявляющих МЛУ

Штаммы бактерий	МПК50 ((мкг/мл)			
	Положительный Контроль		КВМЭЗ	
	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч
<i>K. pneumoniae</i> АТСС ВАА- 2473	2,1±0,03	2,17±0,024	126±0,045	149,5±0,013
<i>K. pneumoniae</i> КРМ9	0,942±0,014	1,52±0,017	169,2±0,006	160,1±0,008
<i>K. pneumoniae</i> КРi1627	0,56±0,046	0,94±0,015	157,1±0,021	155,6±0,009

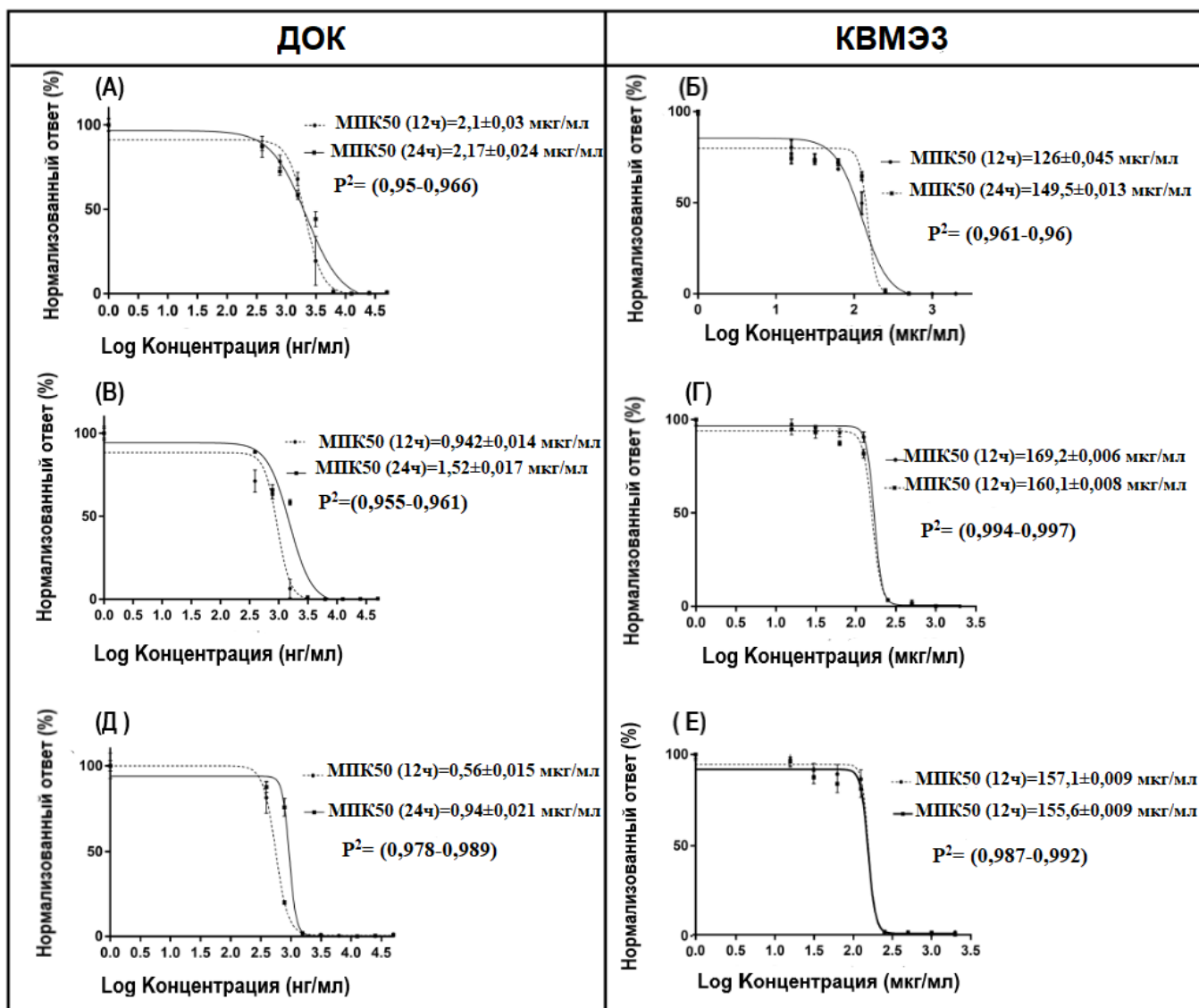


Рисунок 21. МПК50 штаммов *K. pneumoniae*, обработанных КВМЭЗ из жира личинок, по сравнению с доксициклином (Док) в качестве положительного контроля. Значения МПК50 рассчитывали на основе данных турбидиметрического теста и сравнивали с положительным контролем (Док). Мутность планктонных бактерий оценивали для (А, Б) штаммов *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473; (В, Г) штаммов *K. pneumoniae* КРМ9; (Д, Е) штаммов *K. pneumoniae* КРi1627 при 12- и 24-часовой инкубации с (А, В, Д) Док; (Б, Г, Е) КВМЭЗ. Значения МПК50 были рассчитаны с использованием модели нелинейной регрессии Graphpad Prism 7 (Graph Pad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Значения (ПК₅₀) МПК50 представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов \pm среднее значение ошибки стандартного отклонения (SEM).

КВМЭЗ показал значения МПК50 в диапазоне от $149,5 \pm 0,013$ до $160,1 \pm 0,008$ мкг/мл после 24 ч инкубации против всех тестируемых штаммов бактерий. Следует отметить, что значения МПК50 КВМЭЗ снизились с 12 ч ($169,2 \pm 0,006$ - $157,1 \pm 0,009$ мкг/мл) до 24 ч ($160,1 \pm 0,008$ - $155,6 \pm 0,009$ мкг/мл) против штаммов *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* КРi1627 соответственно. Активность КВМЭЗ была более высокой, чем у Saviane и коллеги [320], где

значения МПК50 против штамма *K. pneumoniae* составляли 22,37 мг/мл и 39,28 мг/мл через 12 ч и 24 ч соответственно. Значения МПК50 доксициклина увеличились на 60% с 12 до 24 ч по сравнению с клиническими изолятами КРi1627 и КРМ9 из окружающей среды, в то время как контрольный штамм КР АТСС ВАА-2473 продемонстрировал увеличение МПК50 только на 10% (таблица 16, рисунок 21). *K. pneumoniae* АТСС ВАА-2473 был наиболее устойчив к различной концентрации положительного контроля (Док) по сравнению с обоими изолятами *K. pneumoniae* дикого типа (таблица 16). КВМЭ3 обладал значительным ингибированием, зависящим от концентрации, что указывает на высокую эффективность против штаммов *K. pneumoniae* с МЛУ.

5.4. Оценка устойчивости бактериальных патогенов человека к воздействию КВМЭ3

Антибактериальную устойчивость определяли путем субкультивирования тестируемых штаммов МЛУ-бактерий с 0,125х МПК5 и 0,5х МПК) концентрациями КВМЭ3 или антибиотика в течение 16 последовательных дней. Развитие устойчивости к противомикробным препаратам определяется как значимое при 4-кратном увеличении его исходного МПК [331]. Наши результаты показали, что значения МПК КВМЭ3 оставались неизменными для протестированных штаммов бактерий, включая *K.pneumoniae* АТСС ВАА-2473, *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* КРi1627, что указывает на то, что патогены человека не приобрели устойчивости к активным соединениям из экстракта КВМЭ3 (рисунок 22). Напротив, последовательное пассирование всех протестированных штаммов бактерий, обработанных эталонным антибиотиком (П/С), показало более чем в 4 раза большие значения, чем исходные МПК (рисунок 22), демонстрируя значительное увеличение устойчивости к антибиотикам. Действительно, начальный МПК П/С (9,77 мкг/мл) увеличился до 256 МПК (2500 мкг/мл) для штаммов *K. pneumoniae* КРi1627 и *K. pneumoniae* КРМ9. Для *K. pneumoniae* АТСС ВАА-2473, устойчивость к штамму увеличилась более чем в 4х МПК (> 5000 мкг/мл) по сравнению с исходным МПК (1250 мкг/мл). Таким образом, *K.pneumoniae* АТСС ВАА-2473, *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* КРi1627 не развивают резистентность в ответ на длительное лечение КВМЭ3. Наши результаты согласуются с несколькими исследованиями, которые доказали, что штаммы МЛУ-бактерий не вызывают какой-либо резистентности к ЖК или его производным, в то время как эти микроорганизмы вызывают высокую резистентность к различным категориям антибиотиков [332,333].

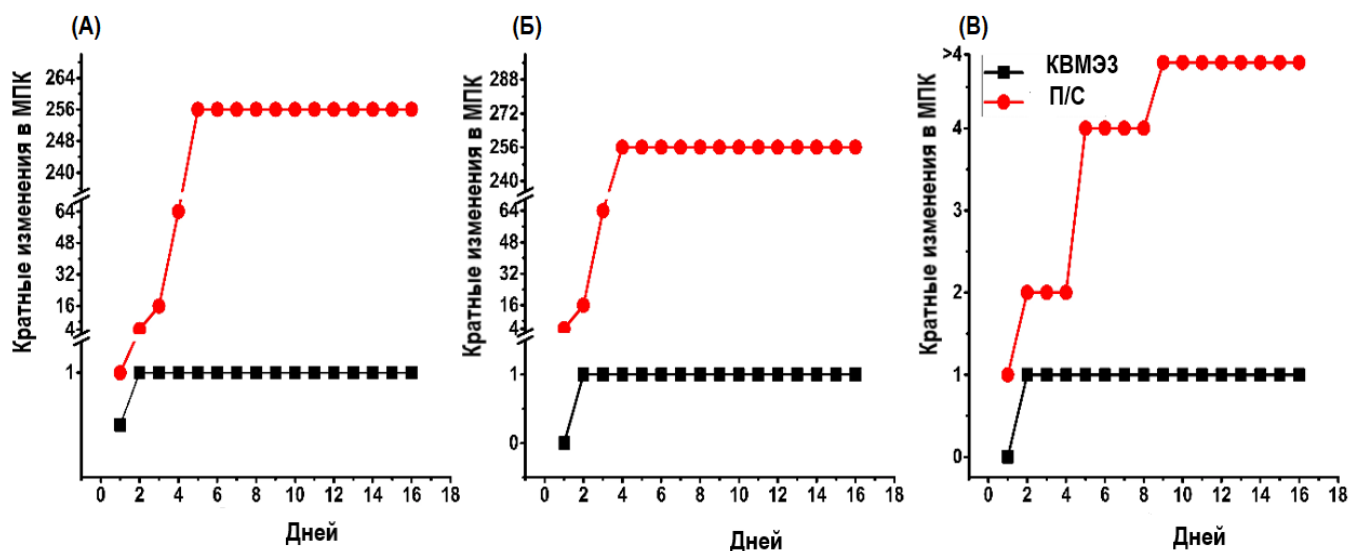


Рисунок 22. Оценка устойчивости штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Измерение сопротивления контролировалось в течение 16 последовательных дней в присутствии субмикрометра (0,125x МПК, 0,5x МПК) КVMЭЗ и положительный контроль (П/С) для (А) *K. pneumoniae* KPi1627, (Б) *K. pneumoniae* KPM9 и (В) *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473. Ось Y представляет самую высокую концентрацию бактерий вовремя пассирования клеток. Приведенные цифры являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

5.5. Цитотоксичность КVMЭЗ

Оценка КVMЭЗ, последовательно экстрагированного из жира личинок *H. illucens*, на предмет потенциальной цитотоксичности (рисунок 23А, В) рассматривается как важный шаг для оценки его свойств для дальнейшего применения. Цитотоксический эффект КVMЭЗ в концентрациях 7,813–1000 мкг/мл был исследован с использованием клеток ЭПЧ-293 человека методом анализа жизнеспособности клеток МТТ, который основан на митохондриальной метаболической способности жизнеспособных клеток. Очевидно, что жизнеспособность клеток снижалась с увеличением концентрации экстракта. КVMЭЗ был токсичен при концентрации выше 500 мкг/мл. Однако клетки, подвергшиеся воздействию более низких концентраций экстракта (250 мкг/мл), сохраняли более 70% жизнеспособности клеток. Цитотоксическая активность КVMЭЗ способна убивать штаммы патогенных бактерий человека в низких концентрациях, но она не убивала эукариотические клетки ЭПЧ-293.

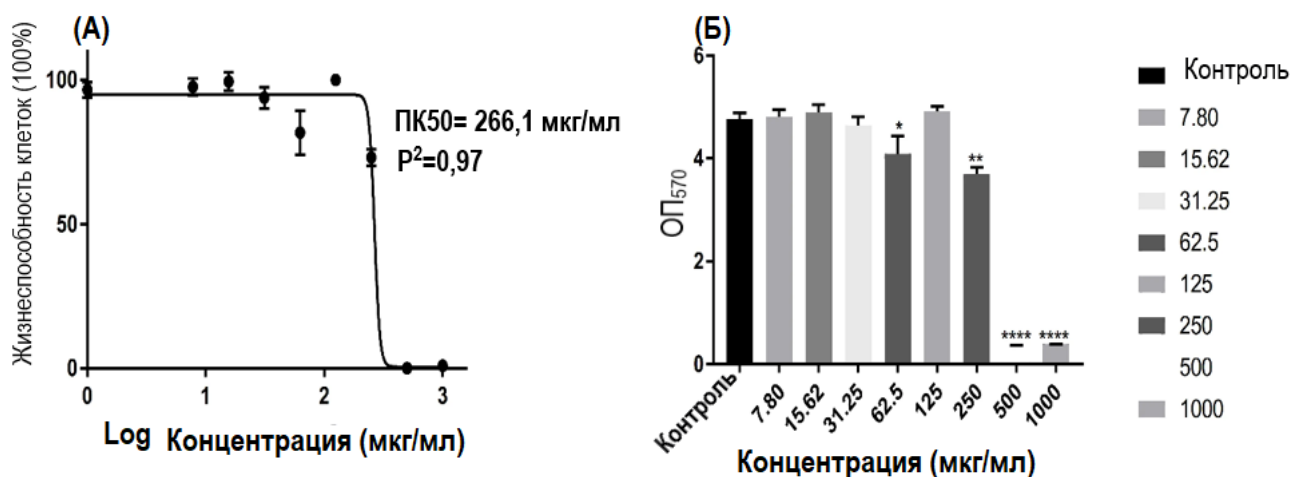


Рисунок 23. Цитотоксичность KBM33 на клеточных линиях ЭПЧ-293 человека. Клетки обрабатывали серией разведений KBM33 в течение 24 ч. Затем жизнеспособность обработанных KBM33 клеток измеряли с помощью МТТ-теста. (А) клеточные линии обрабатывали KBM33 в течение 24 ч (ось X: логарифмические концентрации экстракта KBM33 от 0 до 1000 мкг/мл и ось Y: процент нормализованного поглощения), (Б): среднее значение ОП₅₇₀ клеточной линии ЭПЧ-293, обработанной KBM33 в течение 24 ч (ось Y: нормализованная поглощающая способность ЭПЧ-293 при ОП₅₇₀), ось X: концентрации KBM33 от 0 до 1000 мкг/мл, один из способов ANOVA, используемый для статистического анализа средних значений, и тест множественных сравнений Даннетта, используемый для выявления достоверной разницы ($p < 0,05$). Значения PK50 были рассчитаны с использованием модели нелинейной регрессии Graphpad Prism 7 (GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Все результаты представляют собой среднее значение (\pm SEM) из трех независимых экспериментов, выполненных в трех повторах ($n=8$).

Сообщения о том, что АМП, выделенные из личинок *H. illucens*, безопасны для нормальных клеточных линий человека [334], а также тот факт, что. МПК экстракта личинок *H. illucens* против *E. coli* и *S. aureus* были ниже, чем у нормальных клеток животных, что соответствовало нашим результатам [335]. Экстракт из цветков растения *Cameronian* не показал токсичности, когда его инкубировали в течение 48 ч с нормальными клеточными линиями почек человека ЭПЧ-293 (англ. HEK-293) [336]. Липиды, извлеченные из мозга серебряного карпа обладают защитным действием против окислительного повреждения клеток ЭПЧ-293 человека [234].

Глава 6. КВМЭЗ из жира личинок *H. illucens* повреждать и уничтожает биопленки, образованные штаммами гипермуковиск *K. pneumoniae*

6.1. Образование биопленки

Образование биопленки представляет собой сложный и динамичный процесс, включающий первичное прикрепление бактериальных клеток к биотическому или абиотическому субстрату, сопровождающееся физиологическими изменениями в процессе формирования микробных микроколоний прилипших клеток после размножения бактерий и, наконец, созревания биопленки [337]. Биопленка, образованная гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae* (англ. hvKp), повышает вирулентность патогенности и инвазивность инфекции путем колонизации в дыхательных, желудочно-кишечных и мочевыводящих путях [338]. Во время формирования биопленки бактериальные клетки вырабатывают экзополисахариды, образующие матрицу вокруг клеток для защиты их от суровых условий окружающей среды и воздействия биоактивных агентов. Когда экзополисахариды проникают через внутреннюю мембрану и затем перемещаются на поверхность клетки, они в основном опосредуются насосами оттока [339,340], из чего следует, что ингибирование активности оттока может сильно нарушить сформированную биопленку hvKp [340].

Мы провели анализ биопленки, используя бульонную среду ЛБ в 96-луночном планшете. Основываясь на измерениях красителя КФ, мы обнаружили, что все штаммы KPi1627, KPM9 и KP ATCC-BAА 2473 образовали прочную биопленку (рисунок 24).

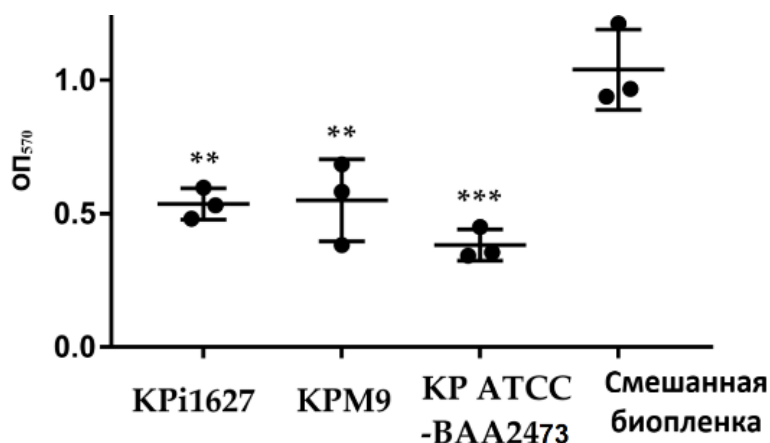


Рисунок 24. Количественное определение образования биопленки штаммов hvKp, сформированных на полистирольных микротитровальных планшетах (статические условия) через 24 часа. Биопленка, измеренная кристаллическим фиолетовым при 570 нм (оптическая плотность, OP₅₇₀). Образование биопленки каждым изолятом оценивалось как сильное (Образование Биопленки (ОБ) ≥ 0,300), умеренное (ОБ = 0,200-0,299), слабое (ОБ = 0,100-0,199) или отрицательное (ОБ < 0,100). Данные были проанализированы с помощью одностороннего теста ANOVA с использованием теста множественного сравнения Тьюки. Результаты указаны в виде

средних \pm SDs. Звездочки указывают на статистическую значимость (** $p=0,003$, **** $p<0,0005$), когда разные штаммы бактерий (KPi1627, KPM9, КР АТСС-ВАА2473) сравнивались со смешанной биопленкой этих штаммов.

Смешанная биопленка, образованная равными объемами (1:1:1) трех разных штаммов, была самой прочной по сравнению с биопленками, образованными единичными штаммами *K. pneumoniae*, за которыми следовали KPM9 и KPi1627 ($p=0,003$). С другой стороны, КР АТСС-ВАА 2473 был самым низким ($p=0,0005$) при образовании биопленки по сравнению со смешанной биопленкой (рисунок 24). Кроме того, все протестированные бактерии были возбудителями МЛУ [233,341] при сравнении штаммов бактерий с их устойчивостью к антибиотикам; более того, было обнаружено, что все штаммы, обладающие способностью образовывать прочные биопленки, были устойчивыми, и эти результаты согласуются с несколькими вопросами [140,342,343].

6.2. Влияние КВМЭЗ на факторы образования биопленки

6.2.1. Анализы агрегации и осаждения

Хорошо известно, что трансформация фенотипа планктонных клеток в адгезивную форму происходит в ответ на изменения окружающей среды. Эти изменения, такие как температура, уровень питательных веществ, рН и ионная сила, влияют на образование биопленки. Эти факторы могут влиять на бактериальную адгезию, свойства поверхности клеток, которые включают гидрофобность, подвижность, образование жгутиков, и свойства поверхности, такие как гидрофобность и шероховатость. Кроме того, свойства поверхности бактериальных клеток, включая внеклеточные придатки, такие как жгутики, фимбрии, и взаимодействия, участвующие между клетками, такие как чувство кворума [344].

МПК и МБК КВМЭЗ были определены ранее в отношении трех планктонных изолятов *K. pneumoniae* (KPi1627, KPM9, КР АТСС-ВАА2473) [345]. МПК и МБК КВМЭЗ показали 250 мкг/мл против этих штаммов, когда их инкубировали при встряхивании при 200 об/мин в течение 24 ч.

Автоагрегация может способствовать образованию биопленки [346]. Поведение автоагрегации мукоидных штаммов проводили в течение 24 ч при комнатной температуре. Был очевиден высокий процент агрегации обработанных и необработанных бактерий (таблица 17, рисунок 25А).

Таблица 17. Влияние КВМЭЗ на аутоагрегацию штаммов *K. pneumoniae*

KPi1627		KPM9		КР АТСС	
Контроль	Обработанный	Контроль	Обработанный	Контроль	Обработанный

98,2±2,3	99,9±0,9	99,7±0,28	98,4±0,74	98,6±1,87	97,05±4,3
----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------

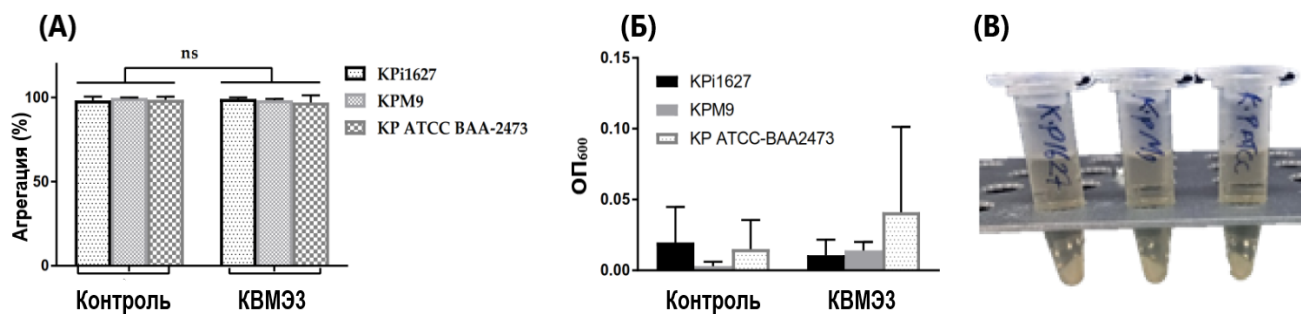


Рисунок 25. Анализ агрегации, вязкости слизи и осаднения штаммов *K. pneumoniae*. Штаммы KPi1627, KPM9 и KP ATCC BAA-2473 культивировали в бульоне ЛБ в течение ночи при 37 °С. Бактериальные клетки, обработанные 0,5 МПК (0,125 мг/мл) KBMЭЗ, не показали никакой мутности при низкой оптической плотности бактериального супернатанта, который не был слизистым (А, Б), при центрифугировании в течение 10 минут при низкой скорости (1000 ×g) и высоком осаднении обработанных и необработанных штаммов с образованием плотных гранул (В).

Автоагрегацию проводили в статических условиях при комнатной температуре, и на нее незначительно ($p=0,995$, $p=0,971$, $p=0,945$) влияло 0,5хМПК (0,125 мг/мл) KBMЭЗ против штаммов KPi1627, KPM9 и KP ATCC BAA-2473 соответственно (рисунок 25А). Кроме того, измеряли оптическую плотность обработанных клеток для определения мутности, образовавшейся после центрифугирования, что показывает незначительные изменения в обработанных бактериях по сравнению с контрольной группой (рисунок 25Б). Все штаммы бактерий *K. pneumoniae* были протестированы на их способность образовывать плотные гранулы центрифугированием, при этом ни один из них не показал образование рыхлых гранулы, все штаммы образовали плотные гранулы (рисунок 25В). Эти результаты показывают, что KBMЭЗ не оказывал существенного влияния на образование гранул штаммов *K. pneumoniae* при обработке 0,5хМПК (0,125 мг/мл), по сравнению с необработанными клетками. Эти результаты согласуются с Song *et al.* [347], которые изучали влияние экстракта грейпфрута на автоагрегацию некоторых штаммов патогенных бактерий.

6.2.2. Тест на образование нити

Мы провели тест на образование нити в качестве начальной оценки вирулентности *K. pneumoniae* [348]. Наши результаты показали, что KPi1627 и KPM9 были положительными (имели длину нити более 5 мм), в то время как KP ATCC BAA 2473 был отрицательным (<5 мм) в тесте на образование нити. KPi1627 был наиболее значимым ($p < 0,0001$) гипервирулентным, слизисто-вязким штаммом среди других бактерий, была зарегистрирована длина нити $51,7 \pm 3,5$ мм, в то

время как для КРМ9 и КР АТСС ВАА-2473 она составила $31 \pm 3,63$ мм и $3,81 \pm 1$ мм, соответственно. Все обработанные изоляты теряют свою слизистую вязкость при воздействии $0,125$ мг/мл КВМЭЗ, по сравнению с контрольными группами (таблица 18, рисунок 26). Большинство штаммов hvKp обычно обладают толстой гипермукоидной капсулой и, следовательно, продуцируют мукоидные колонии, которые дают положительный результат в тесте на нитеобразование, поэтому гипермуковязкий фенотип в основном связан с гипервирулентностью [348]. Капсула является ключевым фактором вирулентности, который повышает устойчивость hvKp к различным антибактериальным агентам и способность образовывать биопленку, что, в свою очередь, придает устойчивость к антибиотикам и голодному стрессу [349,350]. Lev *et al.* [233] сообщили, что КРМ9 и КРi1627 имеют капсульный тип К20 и К2, соответственно. Кроме того, классический *K. pneumoniae* способны приобретать гипермуковизиозность и продуцировать капсулу путем получения вирулентной плазмиды путем конъюгации [351,352].

Таблица 18. Влияние 0,5 МПК КВМЭЗ на гипермуковязкость штаммов *K. pneumoniae*

Напряжение длина нити(мм)	КРi1627	КРМ9	КР АТСС-ВАА2473
Контроль	$51,7 \pm 3,5$	$31 \pm 3,6$	$3,83 \pm 1$
Обработанный	0,0	0,0	0,0

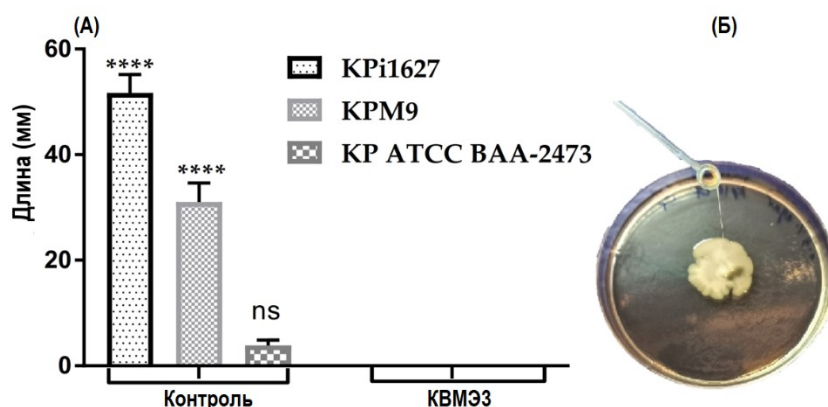


Рисунок 26. Тест на образование нити штаммов *K. pneumoniae*. Бактериальные штаммы культивировали на чашках с агаром ЛБ, инкубировали в течение 72 ч, а затем стерилизованную петлю использовали для размножения бактериальной колонии, выращенной на агаре чашек Петри. Все штаммы, подвергшиеся воздействию $0,5$ МПК ($0,125$ мг/мл) КВМЭЗ, и все обработанные колонии были отрицательными для тестирования строк (А) по сравнению с контрольной группой (Б). Результаты выражены в виде среднего \pm STD трех независимых

экспериментов. Для определения статистической значимости был проведен тест двусторонний ANOVA и тест множественных сравнений Тьюки (**** $p \leq 0,0001$).

6.2.3. Анализ гидрофобности

Гидрофобность углеводов играет ключевую роль в колонизации, адгезии и образовании биопленки и зависит от типа штамма, и органического растворителя [353]. Альтернативно, автоагрегация и гидрофобность сами по себе могут способствовать снижению чувствительности к карбапенему [354]. Тестируемые бактерии показали разную степень гидрофобности. В таблице 19 указано, что самая высокая адгезионная способность наблюдалась у хлороформа, за которым следуют этилацетат, толуол, в то время как самая низкая адгезия наблюдалась у гексана (хлороформ > этилацетат > толуол > гексан).

Таблица 19. Гидрофобность (%) трех штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из разных источников и обработанных 0,5 МПК КВМЭЗ

Углеводороды	КРi1627		КРМ9		КР АТСС ВАА-2473	
	Контроль	Обработанный	Контроль	Обработанный	Контроль	Обработанный
Хлороформ	36,31±2,84	64,9±6,26	44,85±2,03	38,3±2,37	35,99±1,37	44,28±1,7
Гексан	2,42±3,25	10,6±2,9	6,62±5,9	6,62±2,96	1,09±2,7	24,72±4,75
Этилацетат	32,46±13,9	31,05±5,9	31,85±13,97	34,87±12,36	23,99±6,42	44,6±4,25
Толуол	31,19±1,06	33,76±4,3	19,42±4,4	37,55±2,86	41,84±12,28	62,2±1,1

Согласно контрольным группам, КРМ9 показал самую высокую адгезию к хлороформу и гексану (44,85%, 6,62%), за которым следуют КРi1627 (36,31%, 2,42%) и КР АТСС-ВАА2473 (35,99%, 1,09%) (таблица 19, рисунок 27). Самый высокий процент адгезии КРi1627 (32,46%) был зарегистрирован в присутствии этилацетата, за которым следуют КРМ9 (31,85%) и КР АТСС-ВАА2473 (23,99%), как показано в таблице 19 и на рисунке 27. Самая высокая адгезия КР АТСС-ВАА2473 к толуолу составила 41,84% по сравнению с КРi1627 и КРМ9, адгезия которых составила 31,19% и 19,42% соответственно. Мы исследовали гидрофобность путем оценки адгезии патогена к четырем выбранным различным углеводам в присутствии КВМЭЗ при 0,5 МПК (0,125 мг/мл), чтобы определить влияние КВМЭЗ на бактериальную адгезию. КВМЭЗ, выделенный из жира ЛМЧЛ, значительно увеличивал гидрофобность клеточной поверхности ($p < 0,0001$, $p = 0,0004$) в КРi1627 и КРМ9 соответственно, но не имел значительного увеличения КР АТСС-ВАА2473 (таблица 19, рисунок 27А). С другой стороны, КР АТСС-ВАА2473 показал наибольшее значительное увеличение ($p < 0,0001$, $p = 0,009$) адгезии в присутствии гексана и

этилацетата, соответственно, когда этот штамм подвергали воздействию 0,5 МПК КВМЭЗ (таблица 19, рисунок 27Б, В). Все обработанные штаммы бактерий не показали значительного увеличения гидрофобности толуола, кроме того, как обработанные КРi1627, так и КРМ9 показали незначительное увеличение адгезии к этилацетатному растворителю (таблица 19, рисунок 27В). Таким образом, концентрация КВМЭЗ 0,5 МПК (0,125 мг/мл) не влияла на гидрофобность клеточной поверхности КРi1627 и КРМ9 в присутствии гексана, этилацетата и толуола (рисунок 27Б, В, Г). Наиболее интересно, что КВМЭЗ значительно снижал гидрофобность или адгезию клеточной поверхности в КРМ9 ($***p=0,0004$), как показано на рисунке 27А. Эти результаты согласуются с несколькими исследованиями [347,355–357]. Из вышеупомянутых результатов следует, что КРi1627 и КРМ9 являются лучшим донором электронов, чем реципиентом, поскольку они проявляют большую адгезию в присутствии хлороформа. Отсутствие адгезии или гидрофобности *K. pneumoniae* наблюдались в присутствии гексана (рисунок 27Б).

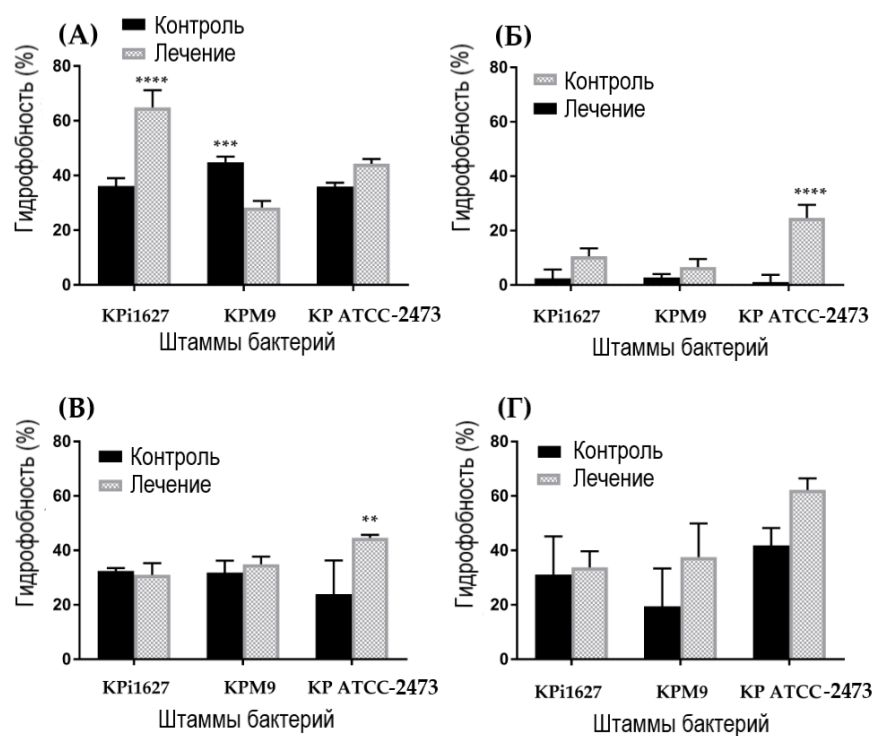


Рисунок 27. Влияние 0,5 МПК (0,125 мг/мл) гидрофобной активности КРi1627, КРМ9 и КР АТСС -2473 на различные углеводороды, (А) хлороформ, (Б) гексан, (В) этилацетат и (Г) толуол. Данные представляют собой средние значения \pm STD ($n = 3$). Данные были проанализированы с помощью двустороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки, значение p варьировалось от $**p = 0,009$ до $****p < 0,0001$.

6.2.4. Влияние КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ на подвижность штаммов *K. Pneumoniae*

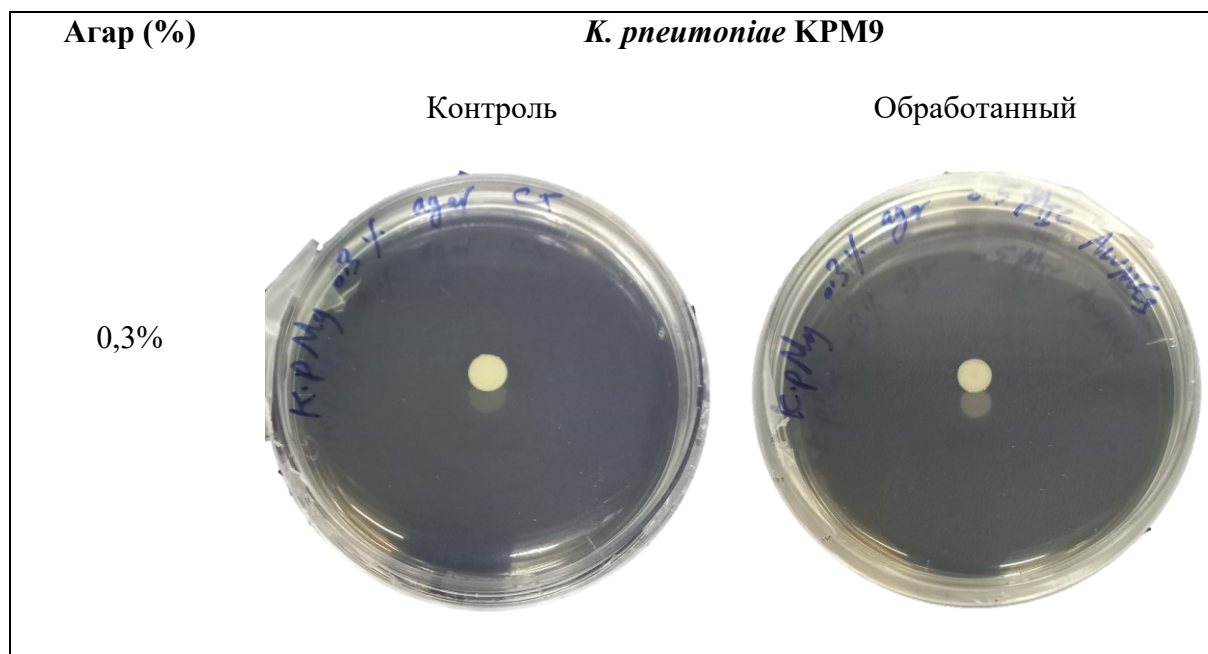
Подвижность необходима для бактериальной колонизации биотических или биотических поверхностей; она помогает микроорганизмам перемещаться в более благоприятную среду и удаляться при неблагоприятных условиях. Подвижность также является важной характеристикой патогенности бактерий из-за ее влияния на адгезию клеток хозяина, колонизацию и образование биопленки [358]. Хотя известно, что *K. pneumoniae* являются неподвижными грамотрицательными палочковидными палочками, Lima и León-Izurieta [359] показали, что *K. pneumoniae*, выделенный у пациента с неонатальным сепсисом, имеет полярные жгутики. Кроме того, он описал фенотип подвижности, подобный плаванию, генерируемый жгутиками у этих клинических изолятов; фенотип с гиперфимбриями обеспечивает своего рода рудиментарную подвижность. Кроме того, в геноме *K. pneumoniae* есть ген *flk*, который кодирует регулятор биосинтеза жгутиков. Таким образом, ограниченное движение, которое наблюдается у мутантного штамма в результате образования фимбрий типа 1 или регулятора KpfR, усиливает экспрессию жгутиковых генов. Sharma *et al.* [360] изучали сравнительную протеомику и системную биологию, чтобы определить корреляцию между уменьшением связанных с подвижностью белков (жгутиков, фимбрий и пили) и образованием биопленки, что может привести к развитию лекарственной устойчивости.

Известно, что некоторые ЖК имитируют факторы вирулентности и контролируют подвижность, фимбриии, гифы и развитие биопленок различных микробов; показано, что олеиновая кислота в качестве ЖК ингибировала подвижность роения и выработку пиоцианина у *P. aeruginosa* [361]. Мы оценили влияние 0,125 мг/мл КВМЭЗ для трех штаммов *K. pneumoniae* на их примитивную подвижность, включая плавание, роение и подергивание, измеренное в диаметре (мм). Как показано в [таблице 20](#), экстракт КВМЭЗ оказывал отчетливое влияние на первичную подвижность *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9 и КР АТСС-ВАА2473, где КВМЭЗ значительно снижал плавучесть ($p = 0,0025$, $p < 0,0001$) штаммов KPM9 и КР АТСС-ВАА2473, соответственно. С другой стороны, не было очевидно никакого существенного влияния 0,5 МПК (0,125 мг/мл) КВМЭЗ на первичную подвижность KPi1627 ([рисунок 28](#), [рисунок 29А](#)). Подвижность штаммов МЛУ KPM9 и ШЛУ КР АТСС-ВАА2473 была значительно снижена ($p=0,007$, $p=0,003$) после воздействия 0,5 МПК (0,125 мг/мл) КВМЭЗ, в то время как KPi1627 не подвергался влиянию после обработки ([таблица 20](#), [рисунок 28](#), [рисунок 29Б](#)). Значительное уменьшение ($p < 0,0001$) диаметров зон подвижности у всех штаммов *K. pneumoniae*, когда они подвергались воздействию 0,125 мг/мл КВМЭЗ ([таблица 20](#), [рисунок 28](#), [рисунок 29В](#)). Эти результаты указывают на то, что КВМЭЗ, вероятно, нацелен на путь определения кворума в этих штаммах бактерий KPM9 и КР АТСС-ВАА2473, тем самым ингибируя образование биопленки и

образование бактериальной инфекции. Все диаметры зон подергивающей подвижности для всех тестируемых штаммов бактерий были уменьшены примерно на 50% при воздействии 0.5 МПК КВМЭЗ, и составили для обработанных КРi1627, КРМ9 и КР АТСС ВАА-2473 $4,23 \pm 0,25$ мм, $4,5 \pm 0,5$ мм, $4,47 \pm 0,25$ мм, по сравнению с контрольными группами $8,5 \pm 0,5$ мм, $9,3 \pm 0,61$ мм, $10,5 \pm 0,5$ мм, соответственно (таблица 20, рисунок 28, рисунок 29В). Наши результаты согласуются с другими исследованиями, в которых сообщалось, что экстракты натуральных продуктов значительно снижают плавательную и роевую подвижность различных штаммов патогенов человека [347,355,362].

Таблица 20. Плавающая, роящаяся и подергивающаяся подвижность у штаммов МЛУ *K. pneumoniae*, включая клинический изолят КРi1627, экологический изолят КРМ9 и лабораторный изолят КР АТСС-2473 в присутствии и отсутствии КВМЭЗ при 0,5 МПК

Подвижность	КРi1627		КРМ9		КР АТСС-ВАА-2473	
	Контроль	Обработанный	Контроль	Обработанный	Контроль	Обработанный
Плавание	$6 \pm 0,5$	$5,23 \pm 0,25$	$7,5 \pm 0,5$	$5,57 \pm 0,4$	$8,9 \pm 0,36$	$5,3 \pm 0,35$
Роением	$8,5 \pm 0,5$	$7,43 \pm 0,4$	$8,83 \pm 0,76$	$7,1 \pm 0,36$	$9,43 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,4$
твитчинг	$8,5 \pm 0,5$	$4,23 \pm 0,25$	$9,3 \pm 0,61$	$4,5 \pm 0,5$	$10,5 \pm 0,5$	$4,47 \pm 0,25$



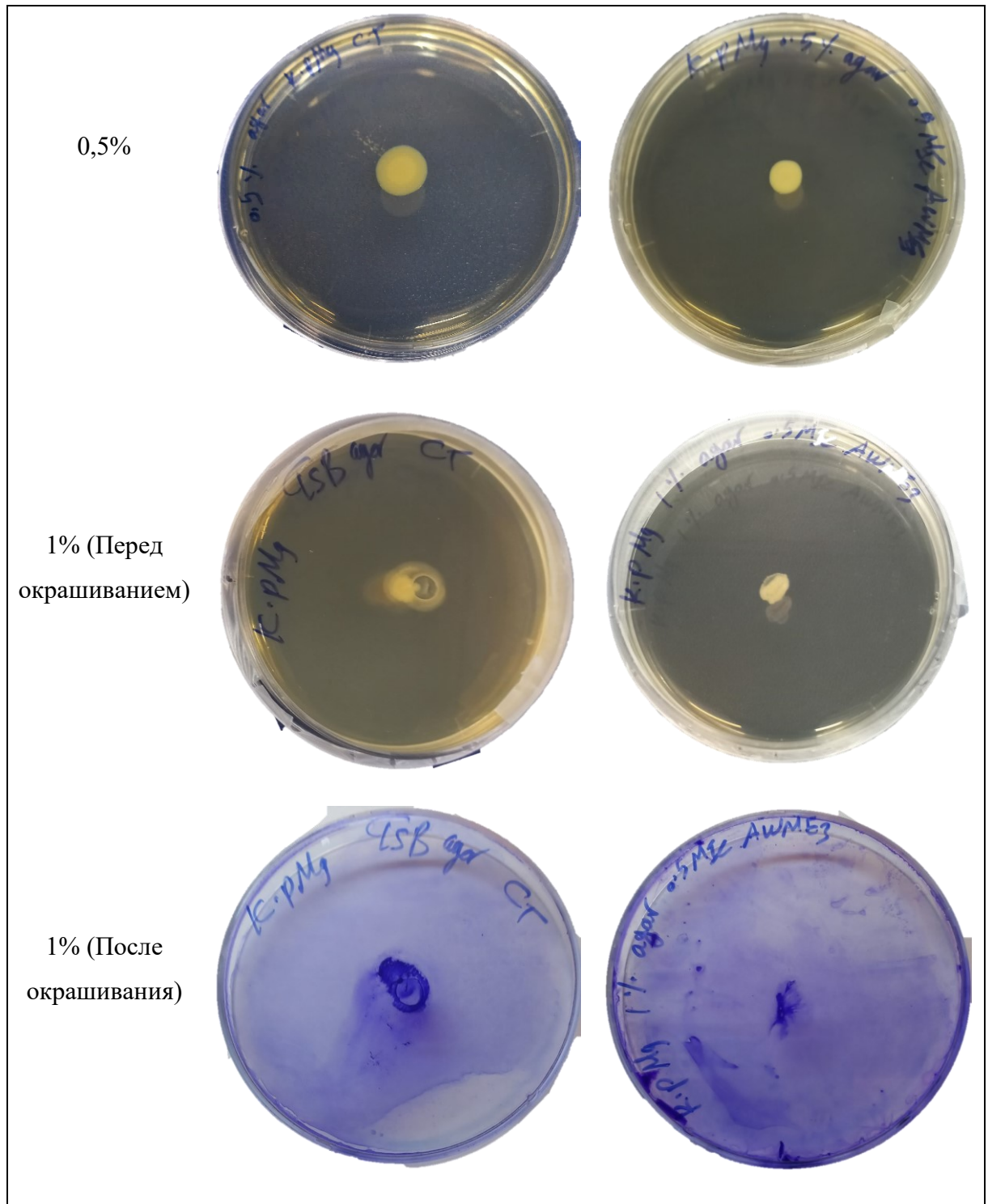


Рисунок 28. Плавающая (0,3% агар), роящаяся (0,5% агар) и подергивающаяся подвижности (1% агар) у штаммов МЛУ-*K. pneumoniae*, изолят КРМ9 из окружающей среды в качестве репрезентативного штамма в присутствии и отсутствии КВМЭЗ при 0,5 МПК (0,125 мг/мл).

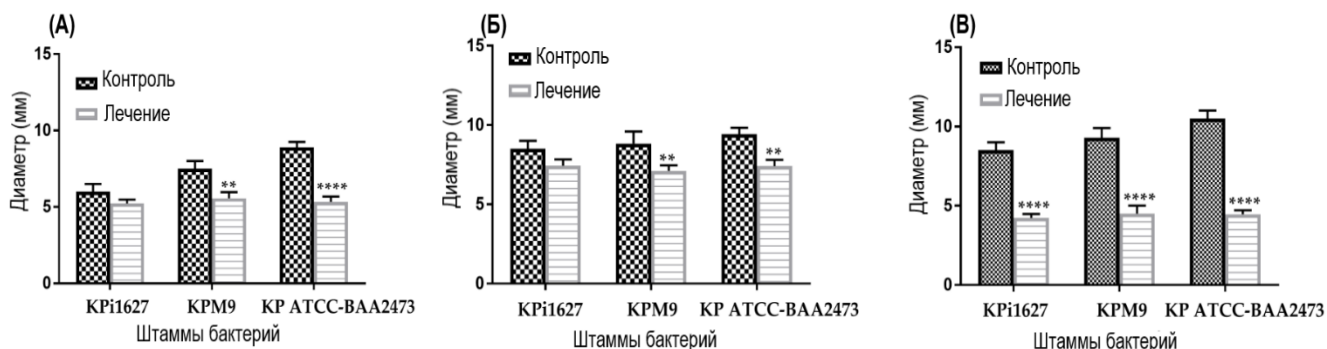


Рисунок 29. Подвижность штаммов *K. pneumoniae* в отсутствие (контроль) и в присутствии КВМЭЗ, выделенного из жира личинок *H. illucens*. (А) Средняя подвижность плавания, (Б) средняя подвижность роения и (В) средняя подвижность подергивания изолятов КРi1627, КРМ9 и КР АТСС-ВАА 2473. Данные представляют собой средние значения \pm SD ($n = 3$). Данные были проанализированы с помощью двустороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Сидака, значение p варьировалось от $**p = 0,003$ до $****p < 0,0001$.

6.3. Уничтожение одиночной и смешанной биопленки, образованной штаммами МЛУ *K. pneumoniae*

Биопленки хорошо постоены таким образом, что бактериальные колонии накапливаются в несколько слоев на биотическом или абиотическом материале, и это способствует их выживанию и стойкости против вредных условий, а также способствует вирулентности во время инфекции. Штаммы *K. pneumoniae* КРi1627, КРМ9 и КР АТСС-ВАА 2473 были способны образовывать прочные биопленки (рисунок 30). Влияние ЖК КВМЭЗ, выделенного из жира личинок *H. illucens*, на образование биопленки штаммами *K. pneumoniae* оценивали с помощью метода кристаллического фиолетового (КФ) (рисунок 30).

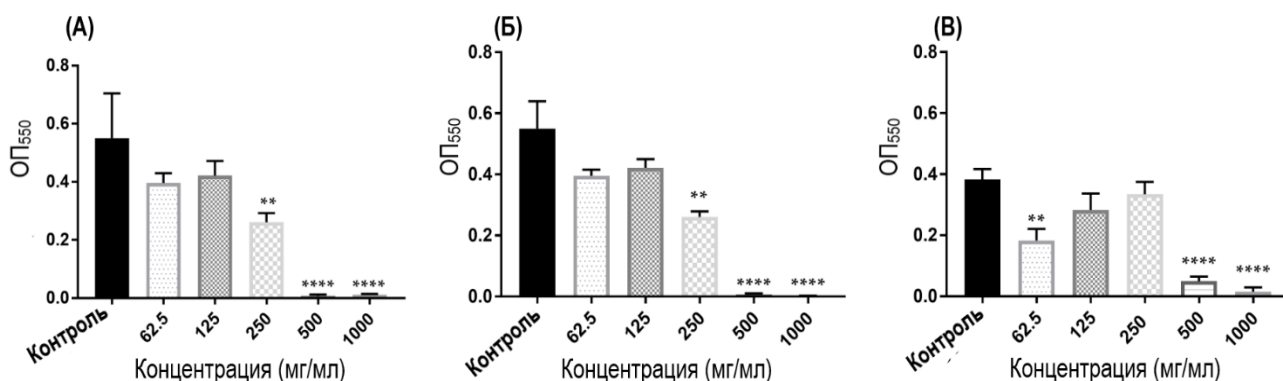


Рисунок 30. Бактерицидное действие КВМЭЗ против предварительно сформированных биопленок всех протестированных штаммов *K. pneumoniae* (А) КРi1627, (Б) КРМ9 и (В) КР АТСС-ВАА2473. Ночные культуры гранулировали, промывали, ресуспендировали в бульонной

среде ЛБ и инокулировали в 96-луночных планшетах при конечной суспензии ($ОП_{600} \sim 0,1$). Каждую бактериальную культуру выращивали в присутствии различной концентрации КВМЭЗ (1000, 500, 250, 125, 62.5 мкг/мл). После 24 ч инкубации биопленку определяли с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым с последующей обработкой 33% уксусной кислотой. Поглощение $ОП_{550}$ измеряли с помощью считывателя микропланшетов CLARIOstar. Эксперименты проводились в трех повторах с независимыми культурами, и статистическую значимость проверяли с помощью одностороннего теста ANOVA с использованием теста множественного сравнения Даннетта. Результаты указаны в виде средних \pm SDs. Звездочки указывают на статистическую значимость (** $p=0,001$, **** $p<0,0001$).

Анализ проводили в среде ЛБ бульона. При анализе окрашивания кристаллическим фиолетовым все штаммы *K. pneumoniae* были значительно ингибированы ($p < 0,0001$) при минимальная ингибирующая биопленку концентрация (МИБК) (0,5 мг/мл) и 2 МИБК (1,0 мг/мл), в то время как КРi1627 и КРМ9 были значительно снижены ($p=0,001$) при 0,5 МИБК (0,25 мг/мл) КВМЭЗ. (рисунок 30А, Б). Наиболее интересно, что биопленка штамма КР АТСС-ВАА2473 была значительно уменьшена ($p=0,007$), когда она подвергалась воздействию 0,125 МИБК (0,0625 мг/мл) КВМЭЗ (рисунок 30В). Кроме того, МИБК и минимальная концентрация уничтожения биопленки (МКУБ) для КВМЭЗ и положительного контроля (Док) были определены на основе анализа микродиллюции на 96-луночном планшете в статических условиях, где МИБК был идентифицирован как самая низкая концентрация КВМЭЗ или Док, которые ингибируют рост бактериальной биопленки. МКУБ также определяли на основе значений МИБК, когда аликвоты по 30 мкл МИБК, 2МИБК и 4 МИБК культивировали на чашках с МН агаром и инкубировали в течение 48 ч при 37 °С. МИБК и МКУБ регистрировали 500 мкг/мл против *K. pneumoniae*, когда их инкубировали в статических условиях для образования биопленки, прилипшей к полистирольным микротитровальным пластинам (таблица 21). Доксициклин (Док), используемый в качестве положительного контроля в этом исследовании, проявлял бактериостатические свойства (МИБК >50 мкг/мл) против *K. pneumoniae* КРi1627, *K. pneumoniae* КРМ9 и *K. pneumoniae* АТСС-ВАА2473, соответственно. Эти результаты показали, что все бактериальные изоляты были более устойчивы в адгезивном состоянии по сравнению с планктонными клетками, которые инкубировали при встряхивании. Кроме того, экстракт КВМЭЗ проявлял бактерицидную активность в отношении всех биопленок, образованных штаммами *K. pneumoniae*, по сравнению со стандартным антибиотиком (Док), который проявлял бактериостатическую активность.

Таблица 21. Уничтожение биопленки штаммов *K. pneumoniae* с помощью КВМЭЗ

Условия инкубации	Агент	Концентрация (мкг/мл)		
		КР АТСС ВАА-2473	КРМ9	КРi 1627
Статические (адгезивные клетки)	МИБК	500	500	500
	КВМЭЗ	МКУБ	500	500
Статические (адгезивные клетки)	МИБК	3.13	6.25	12.5
	Док	МКУБ	>50	>50

Смешанные биопленки, образованные этими тремя возбудителями МЛЮ-инфекции *K. pneumoniae*, часто вызывают внутрибольничную инфекцию в больницах. Активность нашего экстракта КВМЭЗ оценивали в отношении смешанных биопленок, образованных этими вирулентными штаммами. На рисунке 31 показано уничтожение смешанных биопленок, образованных тремя штаммами *K. pneumoniae*, дозозависимым образом, где 2 МИБК (1000 мкг/мл) КВМЭЗ полностью уничтожили ($p < 0,0001$) смешанные биопленки, образованные КРi1627, КРМ9 и КР АТСС-ВАА2473 (рисунок 31).

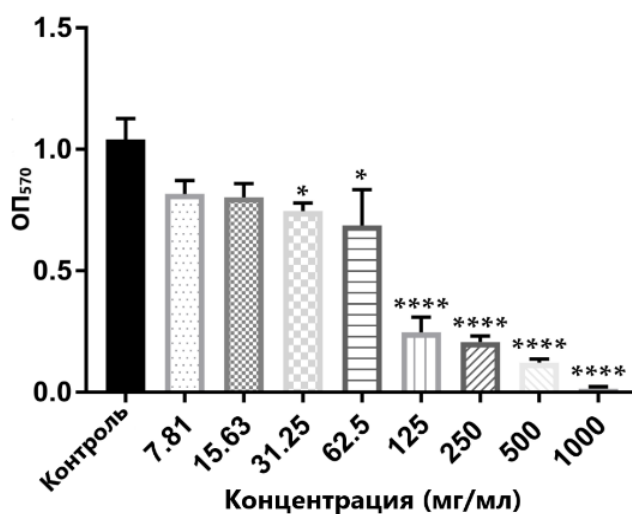


Рисунок 31. Уничтожение и ингибирование роста смешанной биопленки, разработанной смесью трех различных штаммов МЛЮ *K. pneumoniae*. Все протестированные штаммы КРi1627, КРМ9 и КР АТСС-ВАА2473 культивировали отдельно на бульонной среде ЛБ, инкубировали в течение

ночи, промывали, гранулировали, смешивали в равных объемах (1:1:1) в бактериальной суспензии ($OP_{600}=0,1$) в 96-луночном планшете. Далее, окончательные концентрации (7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 мкг/мл) КВМЭЗ последовательно разводили в 2-кратном разведении в бульоне ЛБ, затем добавляли аликвоту из 100 мкл смешанных штаммов бактерий и смешивали с КВМЭЗ. Пластины микротитра запечатывали, а затем инкубировали без встряхивания при 37 °С в течение 48 часов. Реакция ингибирования была проанализирована с помощью метода кристаллического фиолетового, КВМЭЗ, демонстрирующего ингибирование смешанных биопленок в зависимости от дозы. Результаты представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов \pm SDs. Звездочки указывают на статистическую значимость (* $p=0,010$, **** $p < 0,0001$), проанализированную с помощью одностороннего теста ANOVA с использованием теста множественного сравнения Даннетта.

Очевидно, что концентрации 0,25 МИБК (125 мкг/мл), 0,5 МИБК (250 мкг/мл), МИБК (500 мкг/мл) и 2 МИБК (1000 мкг/мл) оказывают очень значительный эффект ($p < 0,0001$) на ингибирование смешанных биопленок (76,3%, 80,01%, 88,2%, 98,56%), соответственно. Кроме того, низкая концентрация нашего экстракта КВМЭЗ значительно снижала ($p=0,010$, $p=0,038$) смешанные биопленки при 1/16 МИБК (62,5 мкг/мл) и 1/32 МИБК (31,25 мкг/мл) до рекордных 28,3% и 33,97% соответственно против смешанных штаммов hvKp (рисунок 31). В целом, результаты показали, что экстракт КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ обладает эффективным антимикробным потенциалом в отношении одиночной или смешанной биопленки, образованной различными штаммами МЛУ *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9 и ШЛУ КР ATCC-ВАА2473, кроме того, в то же время он может ингибировать клеточную адгезию, которая отвечает за контроль за образованием биопленок. Недавние исследования показали, что отдельные или комбинированные жирные кислоты разрушают и уничтожают биопленки, образованные штаммами патогенных бактерий МЛУ [97,361,363]. Наш экстракт КВМЭЗ проявляет более высокую активность по сравнению с экстрактом семян *Withania somnifera*, который содержит большое количество жирных кислот [362], поэтому КВМЭЗ был более мощным, чем различные эфирные масла, используемые для разрушения уропатогенных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих металл- β -лактамазу-1 в Нью-Дели [364].

6.4. КВМЭЗ уничтожает зрелые биопленки, образованные штаммами МЛУ *K. pneumoniae*

Созревание биопленки — это многоступенчатый процесс, при котором планктонные бактериальные клетки первоначально прикрепляются к поверхности с помощью придатков или белков, затем образующиеся микроколонии продуцируют и секретируют компоненты внеклеточного матрикса, которые отвечают за формирование 3D-архитектуры биопленки. Наконец, образуется зрелая биопленка, которую необходимо рассредоточить, чтобы избежать

вредного чрезмерного роста, нехватку питательных веществ и накопления метаболитических соединений. Зрелую биопленку создавали *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9 и *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 после 72 ч инкубации в статических условиях. КВМЭЗ из жира личинок *H. illucens* тестировали на зрелых биопленках, созданных штаммами *K. pneumoniae*, где зрелые биопленки были полностью уничтожены при 1000 мкг/мл КВМЭЗ. Таким образом, рост бактерий не визуализировался после культивирования 30 мкл соскобленной биопленки на чашках с МН-агаром и инкубации в течение 48 ч, с другой стороны, антибиотик (Док) не ингибировал зрелые биопленки даже при 4000 мкг/мл. Кроме того, зрелые биопленки количественно определяли с использованием КФ метода для оценки активности экстракта КВМЭЗ против биопленок штаммов *K. pneumoniae* в 96-луночных планшетах. Из данных, показанных на рисунке 32 видно, что при концентрациях 250, 500, 1000, 2000 мкг/мл КВМЭЗ значительно ($p < 0,0001$) разрушал и ингибировал предварительно сформированные биопленки штаммов *K. pneumoniae* KPi1627, KPM9 и *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473.

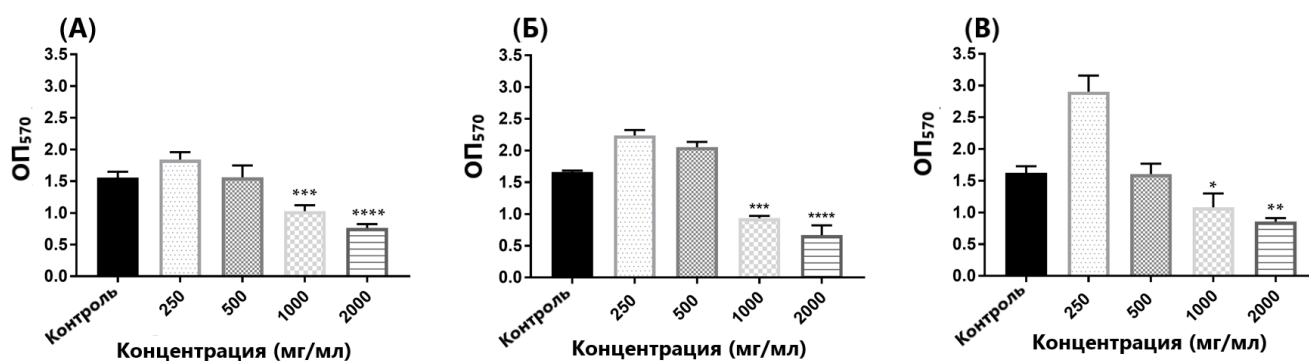


Рисунок 32. Влияние КВМЭЗ из жира личинок *H. illucens* на предварительно сформированные зрелые биопленки штаммов *K. pneumoniae* (А) KPi1627, (Б) KPM9 и (В) КР ATCC-BAА2473. Клетки культивировали в бульоне ЛБ в течение 48 ч при 37 °С в 96-луночных планшетах в статических условиях. Планктонные клетки отбирали, бульонную среду меняли каждые 24 ч, и к предварительно сформированной биопленке добавляли различные концентрации КВМЭЗ (250, 500, 1000, 2000 мкг/мл). Планшет дополнительно инкубировали в течение 24 ч, после чего его промывали для удаления планктонных клеток ФБР ($pH=7,2\pm 2$). Оставшуюся биопленку окрашивали методом окрашивания кристаллическим фиолетовым и определяли количественно при 570 нм. Результаты представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов \pm SDs. Статистическую значимость рассчитывали с использованием дисперсионного анализа одностороннего ANOVA-теста с использованием теста множественного сравнения Даннетта. Звездочки указывают на статистическую значимость **** $p < 0,0001$).

Эффект КВМЭЗ можно было наблюдать для штаммов *K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9 и *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 с уменьшением массы биопленки на (48.6,

67.1, 66.1, 72.5%), (51, 70.1, 72.8, 74.9%), (63.1, 66.5, 68.9, 70,1%) при 250, 500, 1000 и 2000 мкг/мл, соответственно (рисунок 32А, Б, В). Очевидно, что зрелые биопленки, образованные *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, показали высокую чувствительность к КВМЭЗ, при этом биомасса была снижена до 63,1% при обработке 250 мкг/мл (рисунок 32В). Из всех упомянутых выше результатов следует, что ЖК и их производные в экстракте КВМЭЗ были способны ингибировать и уничтожать образование зрелых биопленок, образованных различными штаммами МЛУ hvKp. Предыдущие исследования показали, что натуральный продукт, в частности НЖК и ПНЖК, способен разрушать и ингибировать зрелые биопленки, образуемые штаммами *K. pneumoniae* [145,365,366].

6.5. Проницаемость мембраны бактериальной клетки под действием КВМЭЗ

6.5.1. Проницаемость мембран бактериальных клеток

Проницаемость мембраны клеток *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 под действием КВМЭЗ была подтверждена в этом исследовании несколькими методами, включая определение проницаемости клеточной мембраны, поглощения кристаллического фиолетового и поглощения бромида этидия, что представляет собой набор доказательств деградации клеточной мембраны и и повышения проницаемости, на которые нацелен КВМЭЗ.

Проницаемость клеточной мембраны определяли на основе измерения относительной электропроводности (ОЭ). На рисунок 33 показано влияние КВМЭЗ на ОЭ штамма *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473.

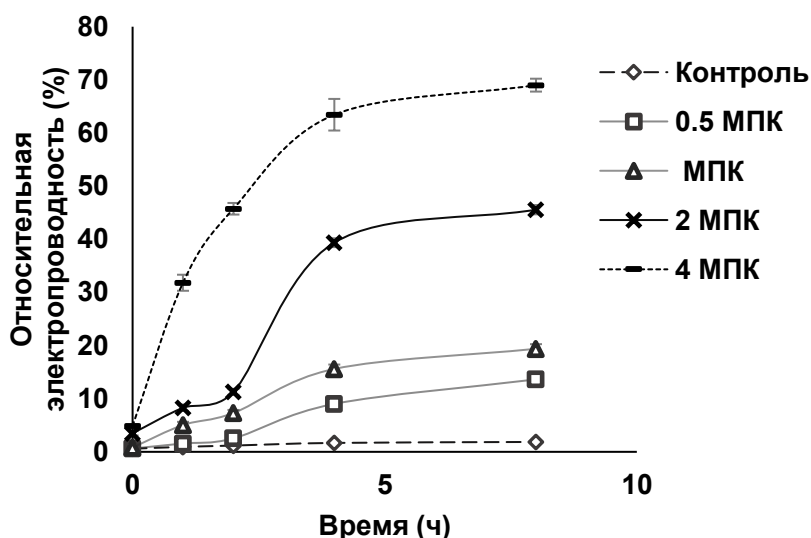


Рисунок 33. Влияние концентраций КВМЭЗ на проницаемость клеточных мембран *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473. Суспензию планктонных бактерий при 10^8 КОЕ/мл подвергали воздействию различных концентраций КВМЭЗ в диапазоне от 0,5 МПК (125 мкг/мл) до 4 МПК (1000 мкг/мл) и инкубировали в течение 8 ч при 37 °С. Относительная электропроводность (ОЭ)

рассчитывали через 0, 1, 2, 4 и 8 ч на основе от значений электропроводности. Необработанные бактерии КВМЭЗ рассматривали как отрицательный контроль. Все значения представлены как среднее значение трех независимых экспериментов $\pm SD$.

В ОЭ контрольных (необработанных) планктонных бактерий зафиксировано незначительное увеличение, что может быть результатом стандартного лизиса и гибели бактерий. Обработка КВМЭЗ в диапазоне концентраций 0,5 – 2 МПК продемонстрировала двухфазный эффект на ОЭ с плавным подъемом ко второму часу и с последующим более выраженным увеличением к четвертому часу, а также с почти сглаженным изменением в течение следующих четырех часов. Действительно, ОЭ постепенно увеличивался в течение первых четырех часов, достигнув увеличения в 1,5 раза до $13,62 \pm 1,29\%$ и $19,38 \pm 0,87\%$ против 0,5 МПК и 1 МПК соответственно к восьми часам. Более выраженное увеличение ОЭ до $45,57 \pm 0,87\%$ и $69 \pm 1,21\%$ было вызвано 2 МПК, 4 МПК, соответственно, при том же времени инкубации. Примечательно, что 4 МПК индуцировало быстрое резкое увеличение к первому часу инкубации, регистрируя ОЭ $31,82 \pm 1,21\%$. К восьмому часу воздействия КВМЭЗ ОЭ *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473 в контроле, 0,5 МПК, 1 МПК, 2 МПК и 4 МПК были $1.86 \pm 0.12\%$, $13.62 \pm 1.29\%$, $19.38 \pm 0.87\%$, и $69 \pm 1,21\%$, соответственно (рисунок 33). Следовательно, КВМЭЗ дозозависимо увеличивал количество обработанных бактерий, что указывает на утечку бактериальных электролитов из-за нарушения проницаемости клеток, вызванного обработкой КВМЭЗ. На проницаемость мембраны бактериальной клетки могут влиять экзогенные жирные кислоты, особенно те, которые содержат цис-изомеры. Включение цис-неНЖК, таких как линолевая кислота (18:2), может нарушить динамику мембраны, увеличивая проницаемость мембраны. Кроме того, расположение первой двойной связи в неНЖК может существенно влиять на проницаемость мембраны [97]. Здесь мы продемонстрировали, что КВМЭЗ ЖК дозозависимо увеличивал относительную проводимость обработанных бактерий *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473, что указывает на утечку внутриклеточных бактериальных электролитов из-за нарушения проницаемости клеток, вызванного обработкой КВМЭЗ. Кроме того, Uppu *et al.*, 2017 [367] показали, что мембраноактивные агенты против *K. pneumoniae* и различных штаммов грамотрицательных бактерий действовали через разрушение бактериальных мембран в качестве основной мишени для терапевтической атаки. Таким образом, наблюдение в нашем исследовании проницаемость мембраны *K. pneumoniae*, индуцируемая ЖК из КВМЭЗ, соответствует другим опубликованным результатам.

6.5.2. Поглощение кристаллического фиолетового

Кристаллический фиолетовый (КФ) обладает низким проникновением в неповрежденные клеточные мембраны, в то время как он может легко проникать и проходить через поврежденную клеточную мембрану [368]. Мы протестировали все штаммы *K. pneumoniae* с помощью этого анализа и обнаружили, что они проявляют различное поведение в отношении поглощения КФ, что было очевидно по активности КВМЭЗ в отношении тестируемых штаммов бактерий (рисунок 34).

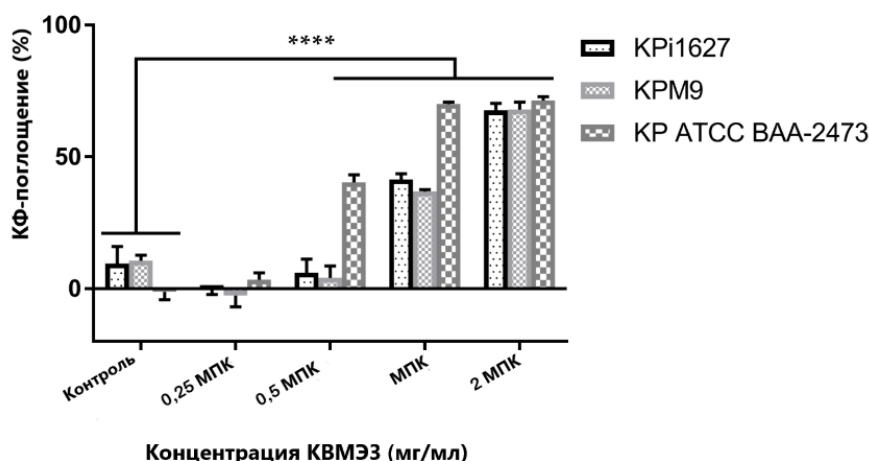


Рисунок 34. Способы действия КВМЭЗ на поглощение КФ мембраной клеток *K. pneumoniae*. Штаммы бактерий обрабатывали концентрациями КВМЭЗ 0,25 МПК (0,0625 мг/мл), 0,5 МПК (0,125 мг/мл), 0,250 мг/мл и 2 МПК (0,5 мг/мл) в течение 4 ч. Проницаемость мембраны рассчитывали после измерения поглощения кристаллического фиолетового красителя. Все данные были выражены в виде среднего \pm SD трех независимых экспериментов. Статистический анализ проводился с использованием дисперсии двусторонний ANOVA и теста множественных сравнений Даннетта ($p < 0,05$).

K. pneumoniae ATCC BAA-2473 оказался наиболее чувствительным среди других штаммов к КВМЭЗ, выделенному из жира личинок ЛМЧЛ, что показано значительным ($p < 0,0001$) увеличением поглощения КФ, когда бактерии подвергались воздействию 0,5 МПК, МПК и 2 МПК КВМЭЗ в течение 4 ч, что составило 40,4%, 70,05% и 71,43%, соответственно, по сравнению с необработанными бактериями (1,15%) (рисунок 34). Все протестированные вирулентные штаммы МЛУ показали высокое достоверное увеличение ($p < 0,0001$) поглощения КФ по сравнению с соответствующими контрольными группами, когда они подвергались воздействию МПК, 2 МПК КВМЭЗ. Основываясь на поглощении КФ, проницаемость мембраны *K. pneumoniae* заметно увеличилась до рекордных 6,05%, 4,13%, 40,38% против KPi1627, KPM9, KP ATCC BAA-2473, соответственно, когда их обрабатывали 0,5 МПК (0,125 мг/мл) КВМЭЗ. Проницаемость значительно увеличилась и составила 41,48%, 36,83% и 70,05% по сравнению с

KPi1627, KPM9, КР АТСС ВАА-2473, соответственно, когда штаммы бактерий подвергали воздействию МПК (0,25 мг/мл) экстракта КВМЭЗ (рисунок 34). Воздействие самой высокой концентрации 2 МПК (0,5 мг/мл) смеси жирных кислот, преобладающих в экстракте КВМЭЗ, привело к наблюдаемым структурным изменениям в клеточных мембранах грамотрицательных *K. pneumoniae*. Это изменение значительно увеличило поглощение КФ ($p < 0,0001$), достигнув 67,7 %, 67,9% и 71,43% против KPi1627, KPM9, КР АТСС ВАА-2473, соответственно, по сравнению с их контрольными группами (9.6%, 10.7%, 1.14%) (рисунок 34). Из этих результатов очевидно, что КФ поглощение является важным и специфическим инструментом, что доказывает высокую активность КВМЭЗ против *K. pneumoniae* и явные доказательства проницаемости клеточных мембран. Наши выводы соответствовали результатам нескольких исследований [97,144,369,370], который использовал поглощение КФ в качестве доказательства разрушения клеточной мембраны антибактериальными жирными кислотами и натуральными продуктами.

6.5.3. Поглощение бромида этидия

Жирные кислоты из экстракта КВМЭЗ изменяли и повышали проницаемость мембран всех протестированных штаммов *K. pneumoniae*, показано, что эти изменения в структуре фосфолипидов мембраны стимулировали поглощение КФ. Кристаллический фиолетовый материал имеет тенденцию связывать поверхностные компоненты (например, глюкоза, белки) бактериальных клеток; эти незначительные изменения проницаемости были дополнительно исследованы и оценены с использованием бромида этидия в качестве другого инструмента измерения проницаемости мембран. Если экстракт КВМЭЗ проницаем или более сильно разрушает бактериальную мембрану, бромид этидия сможет проникать в клетку и связывать ДНК, вызывая увеличение флуоресценции. Анализ на бромистый этидий представляет собой лучшую оценку проницаемости, вызванной КВМЭЗ, и подтверждает результаты КФ-поглощения. По сравнению с контролем, КВМЭЗ вызывал меньшую интенсивность выделения бромистого этидия, исключенного из бактерий в течение 8 часов (рисунок 35А, Б).

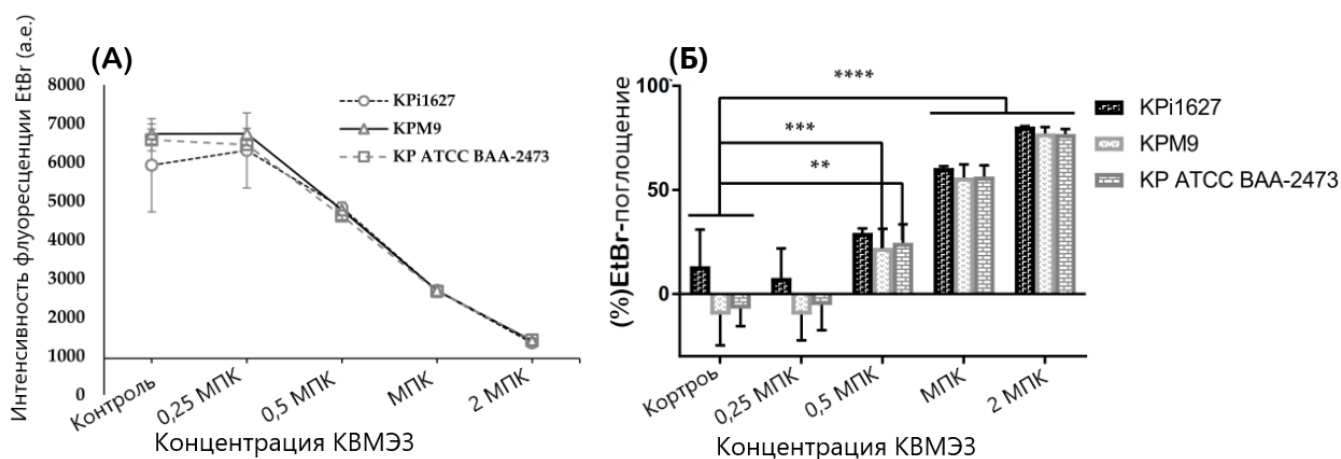


Рисунок 35. Поглощение бромида этидия в качестве инструмента измерения дестабилизации мембран клеток *K. pneumoniae* KPi1627, *K. pneumoniae* KPM9 и *K. pneumoniae* K РАТСС-ВАА2473 с помощью KBMЭЗ. Все штаммы обрабатывали 0,25 МПК (0,62,5 мг/мл), 0,5 МПК (0,125 мг/мл), МПК (0,25 мг/мл) и 2 МПК (0,5 мг/мл) KBMЭЗ в течение 8 часов. Разрушение мембраны определяли путем измерения поглощения EtBr в трех повторах (А), процент (%) поглощения EtBr рассчитывали для обработанных бактерий на основе значений интенсивности флуоресценции EtBr (Б). Все данные представляют собой среднее значение \pm STD трех независимых экспериментов. Для определения статистической значимости был проведен тест двусторонний ANOVA и тест множественных сравнений Даннетта (** $p=0,001$, *** $p\leq 0,0009$, **** $p\leq 0,0001$).

Величина поглощения EtBr, представленная в сигналах, уменьшается на основе нормализованных данных (рисунок 35А). Значительное ($p < 0,0001$) увеличение поглощения EtBr, когда штаммы *K. pneumoniae* подвергались воздействию МПК (0,25 мг/мл) и 2 МПК (0,5 мг/мл) KBMЭЗ (рисунок 35Б). Значения поглощения EtBr для МПК и 2 МПК KBMЭЗ составили 60,56%, 80,43% и 55,98%, 77,2% и 56,37%, 76,88% против штаммов KPi1627, KPM9 и KP ATCC BAA-2473, соответственно, по сравнению с контрольными группами (13,29%, 10,03%, 7,12%) (рисунок 35Б). Штамм KP ATCC BAA-2473 был наиболее чувствительным к KBMЭЗ среди других штаммов. Поглощение EtBr значительно увеличилось ($p < 0,0009$, $p < 0,001$) при 0,5 МПК (0,125 мг/мл) KBMЭЗ по сравнению с KPM9 и KP ATCC BAA-2473 соответственно (рисунок 35Б). Все упомянутые выше результаты указывают на то, что KBMЭЗ способен проникать и проникать клеточные мембраны всех штаммов *K. pneumoniae* дозозависимым образом, что было доказано с помощью анализов КФ и EtBr-поглощения. Кроме того, наши результаты согласуются со многими предыдущими исследованиями [97,144,371–373].

6.6. Разрушенная зрелая биопленка, наблюдаемая с помощью световой микроскопии

Различные методы микроскопии используются для обнаружения разрушения биопленок, установленных штаммами *K. pneumoniae*, для которых *K. pneumoniae* ATCC-ВАА2473 был выбран в качестве репрезентативного штамма. Световая, флуоресцентная и сканирующая электронная микроскопии использовались в качестве методов прямого микроскопирования для сбора наглядной информации об обработанных биопленках. КФ применяли для окрашивания биопленок, образованных на стеклянных покровных листах, для исследования и анализа с помощью световой микроскопии влияния КВМЭЗ при 0,5 МИБК (0,25 мг/мл), МИБК (0,5 мг/мл) и 2 МИБК (1 мг/мл) на бактериальные клетки. В контрольной группе (бактерии без обработки) под микроскопом наблюдали плотно-спутанные, похожие на коврик биопленки, образовались множественные слои неповрежденной биопленки плоской формы, кроме того, появилось несколько темных зон скопившихся клеток. Большая запутанная сетка из-за присутствия пенополистирола, который образует матрицу из соединенных нитей, которые могут защитить биопленку от любых опасных условий (рисунок 36А).

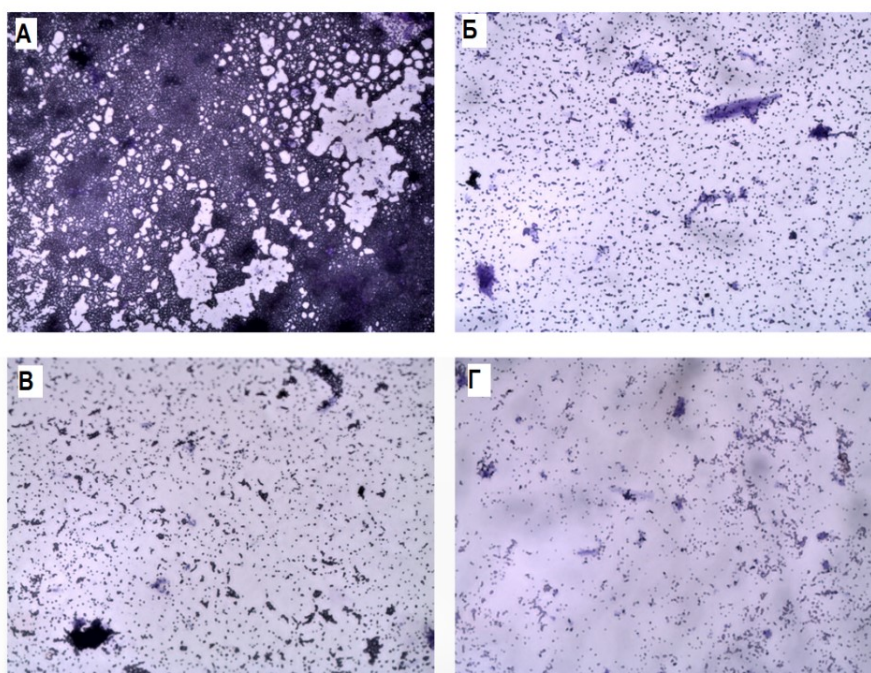


Рисунок 36. Разрушенные созревшие биопленки штамма *K. pneumoniae* КР ATCC ВАА-2473, образованные КВМЭЗ на стеклянных поверхностях, исследовали с помощью световой микроскопии (40-кратное увеличение). (А) Контроль роста без обработки; (Б, В, Г) Бактерии обрабатывали КВМЭЗ в концентрациях 0,5 МИБК (0,25 мг/мл), МИБК (0,5 мг/мл) и 2 МИБК (1 мг/мл), соответственно.

Воздействие дозы 0,25 мг/мл МПК КВМЭЗ приводило к уменьшению количества клеток, снижению полских форм, деградации кластеров и минимальной агрегации клеток, что было

очевидным (рисунок 36Б). МИБК КВМЭЗ (0,5 мг/мл) проявлял хорошую антибиопленочную активность, поскольку наблюдалась сниженная агрегация клеток по сравнению с контролем и более низкие концентрации КВМЭЗ (рисунок 36В). При самой высокой концентрации 2 МИБК (1,0 мг/мл) КВМЭЗ эффективно ингибировал образование зрелой биопленки в *K. pneumoniae* КР АТСС ВАА-2473, что было очевидно по полному отсутствию кластеров или агрегированных клеток. Кроме того, присутствовало много пробелов, и бактериальные клетки выглядели как минимальные клетки (рисунок 36Г).

6.7. Флуоресцентная микроскопия с йодидом пропидия

Потенциал КВМЭЗ в отношении бактериальной биопленки, описанный выше, был дополнительно подтвержден окрашиванием пропидеума йодидом (PI) с использованием флуоресцентной микроскопии (рисунок 37), обнаруженной при двух разных длинах волн (543/617 нм). Фильтр возбуждения/излучения для красного цвета.

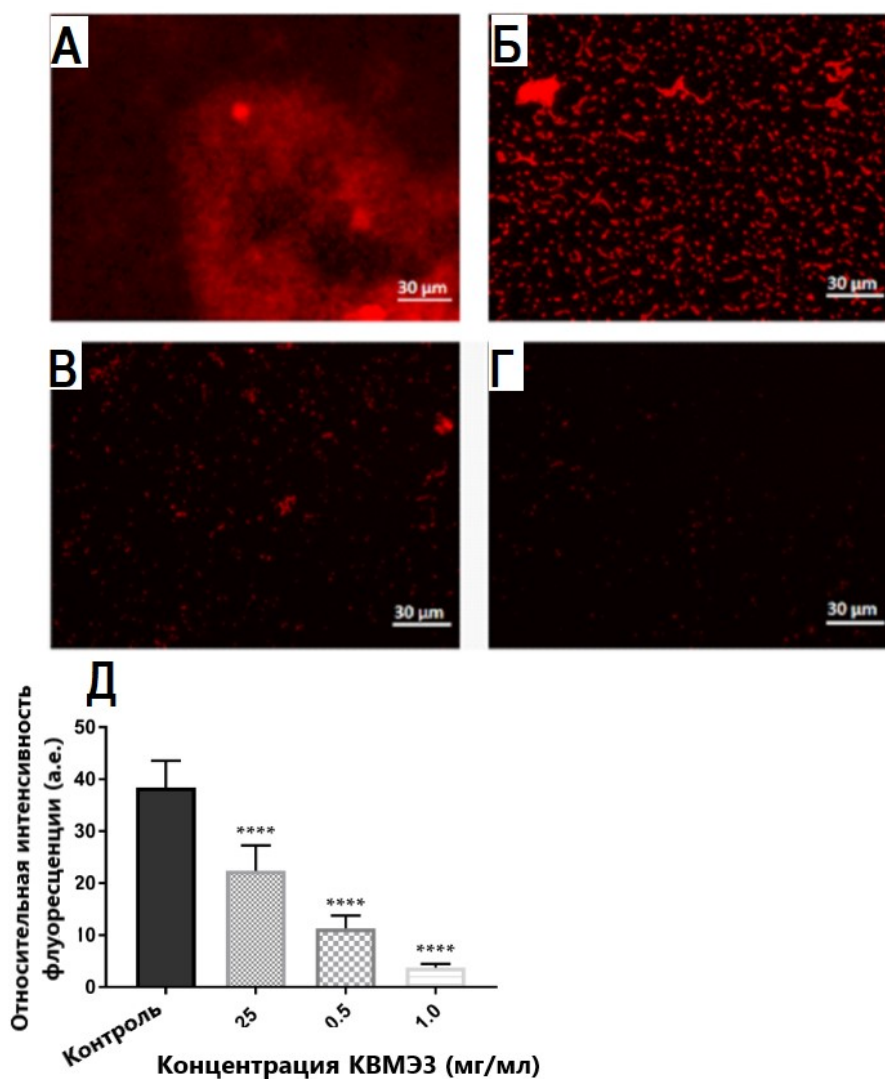


Рисунок 37. Изображения при флуоресцентной микроскопии (А) необработанной клеточной (контрольной) биопленки, созданной штаммом КР АТСС-ВАА2473, обработанным (Б) 0,5 МИБК (0,25 мг/мл), (В) МИБК (0,5 мг/мл) и (Г) 2 МИБК (1,0 мг/мл) КВМЭЗ. ПИ-окрашивание, используемое для окрашивания биопленки с обработкой или без нее, выполняемой на покровных предметных стеклах. Относительная интенсивность флуоресценции архитектуры биопленки в штамме КР АТСС-ВАА2473 (Д) указывается в произвольных единицах (a.u) и анализируется с использованием изображения Fiji J. Данные выражены в виде среднего \pm SDs. **** $p < 0,0001$ был значимым по сравнению с контрольной группой, и все изображения были визуализированы при 40-кратном увеличении.

Как показано на изображениях контролей, тестируемый штамм бактерий образовывал очень плотные биопленки, окрашивающие покровные стекла. Были визуализированы плотные скопления клеток в биопленках, и было видно, что бактерии были сильно колонизированы и прилипли к нескольким слоям. Воздействие различных концентраций КВМЭЗ привело к значительному снижению интенсивности йодид пропидия (англ. PI) ($p < 0,0001$), и бактериальные клетки были обнаружены в рассеянной форме (рисунок 37Б, В, Г, Д). Низкие маты, нити и сгустки были обнаружены, когда бактериальные биопленки обрабатывали 0,5 МИБК (0,25 мг/мл), дополнительно обработанные клетки были обнаружены разбросанными, и между клетками было очевидно много пробелов (рисунок 37Б). Высокая концентрация в МИБК (0,5 мг/мл) КВМЭЗ значительно снижала количество клеток, интенсивность и минимальное количество бактериальных клеток были очевидны (рисунок 37В). Концентрация 2 МИБК (1,0 мг/мл) оказывает наибольшее значимое влияние ($p < 0,0001$) на *K. pneumoniae* КР АТСС-ВАА2473, только несколько бактериальных клеток прилипли к покровным предметным стеклам в рассеянном виде, и была очевидна самая низкая интенсивность флуоресценции по сравнению с контрольной группой, как показано на рисунке 37Д. Эти результаты дополнительно продемонстрировали, что КВМЭЗ жира ЛМЧЛ ингибирует образование бактериальных биопленок дозозависимым образом.

6.8. Разрушенная биопленка, визуализируемая с помощью СЭМ

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) применяли для визуализации разрушения биопленки после обработки КВМЭЗ. В необработанных биопленках, созданных *K. pneumoniae*, клетки КР АТСС ВАА-2473, по-видимому, агрегировали и накапливались в нескольких слоях (рисунок 38А, Б, В). Кроме того, никаких морфологических изменений не было обнаружено в необработанных клетках, все клетки были гладкими с неповрежденной клеточной стенкой и мембранами (рисунок 38В).

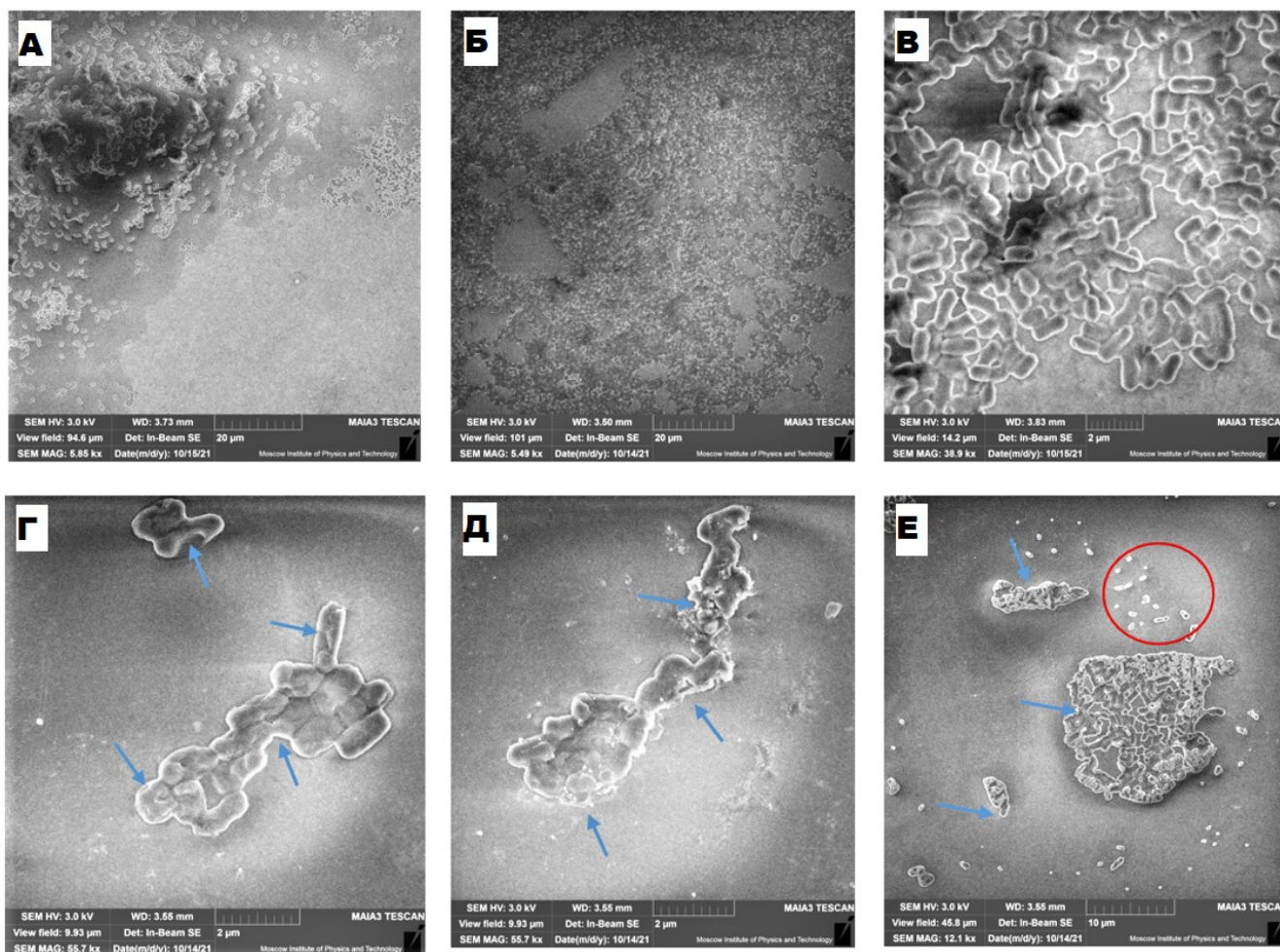


Рисунок 38. СЭМ-микрофотографии биопленок *K. pneumoniae* ATCC-BAА 2473, полученных на поверхности предметного стекла, инкубировали в течение 30 ч при 37 °С. Необработанная биопленка при различном увеличении (5,49-55,7 Кх) (А, Б, В), обработанные биопленки 0,5 МИБК (0,25 мг/мл) (Г), МИБК (0,5 мг/мл) (Д) и 2 МИБК (1,0 мг/мл) (Е) КВМЭЗ.

Наблюдалось значительное уменьшение количества прилипших бактерий в биопленке, обработанной КВМЭЗ, по сравнению с контрольными клетками. Наблюдалось очевидное разрушение биопленки при воздействии различных концентраций КВМЭЗ (рисунок 38Г, Д, Е). Анализ СЭМ также показал морфологические изменения среди бактериальных клеток в культуре, обработанной КВМЭЗ, клетки были грубыми с морщинистой клеточной стенкой, порами и поврежденными во многих местах, как указано синими стрелками (рисунок 38Г, Д, Е). Лизированные клетки, остатки клеточной стенки и клетки-призраки были очевидны, когда биопленки обрабатывали 2 МИБК (1,0 мг/мл) КВМЭЗ (см. синие стрелки и красный цикл на рисунке 38Е). Наиболее выраженный эффект можно было наблюдать у тестируемого штамма КР ATCC-BAА2473, у котором биопленка была уменьшена до монослоя прилипших клеток и были обнаружены даже единичные клетки (рисунок 38Г, Д, Е). Эти данные свидетельствуют о том, что КВМЭЗ является потенциальным антибактериальным агентом, который искажает зрелые

био пленки и предотвращает дальнейшее прогрессирование заболевания этими МЛУ-бактериями, вызывающими респираторные инфекции. В целом, все методы микроскопии показали, что экстракт КВМЭЗ, выделенный последовательно из жира ЛМЧЛ, ингибировал и значительно разрушал био пленку, построенную штаммами *K. pneumoniae*. Эти результаты согласуются с другими исследованиями, которые продемонстрировали способность жирных кислот и их глицеридов ингибировать и уничтожать одиночные или смешанные био пленки, образованные различными видами микроорганизмов через утечку клеточной стенки / клеточной мембраны, дальнейшее нарушение цепи переноса электронов, блокирование ферментов и дефицит поглощения питательных веществ [97,144,362,365,374]. Кроме того, эти механизмы противовирусного и антибио пленочного действия различных ЖК из широкого спектра биологических источников, таких как водоросли, животные и растения, в качестве следующего поколения антибактериальных агентов были рассмотрены другими исследователями [96,375]. Данные показывают, что наши результаты могут проложить путь для экстракта КВМЭЗ в качестве многообещающего антибактериального и антибио пленочного агента-кандидата, полезного при лечении внутрибольничных бактериальных инфекций МЛУ и бактерий полости рта, способных образовывать био пленки.

Г	10 мкг	16,9±0,68 (Ч)	16,47±0,47 (Ч)	17,88±0,92 (Ч)	17,68±0,78 (Ч)	≤12	13-14	≥15
Хл	30 мкг	25,87±0,56 (Ч)	24,52±0,44 (Ч)	22,25±0,76 (Ч)	22,17±0,54 (Ч)	≤12	13-17	≥18
К	30 мкг	15,48±0,45 (П)	13,48±0,41 (Р)	28,23±0,94 (Ч)	27,97±0,71 (Ч)	≤13	14-17	≥18
Док	30 мкг	21,55±0,46 (Ч)	21,37±0,43 (Ч)	18,37±1 (Ч)	18,28±0,6 (Ч)	<12	13-15	≥16
П/С	10 Ед-10 мкг	15,75±0,5 (Ч)	14,45±0,46 (Ч)	15,6±0,34 (Ч)	14,35±0,25 (Ч)	≤11	12-14	14-22
КТ	10 мкг	0 (Р)	0,0 (Р)	9,58±0,56 (Р)	9,72±0,57 (Р)	≤10	-	≥11
РД	5 мкг	36,18±0,83 (Ч)	35,45±0,78 (Ч)	13,62±0,58 (Р)	12,77±0,46 (Р)	≤16	17-19	≥20
Э	15 мкг	17,5±0,45 (П)	15,32±0,87 (П)	13,42±0,42 (Р)	12,52±0,41 (Р)	≤13	14-22	≥23
ВА	30 мкг	14,37±0,43 (Р)	13,48±0,87 (Р)	0,0 (Р)	0,0 (Р)	-	-	≥15
П	2 Ед	34,75±0,99 (Ч)	34,25±0,82 (Ч)	0,0 (Р)	0,0 (Р)	≤28	-	≥29

Обозначения. Г, гентамицин; Хл, хлорамфеникол; К, канамицин; Док, доксициклин; П/С, пенициллин-стрептомицин; КТ, колистин; РД, рифампицин; Э, эритромицин; ВА, ванкомицин; П, пенициллин; Р, резистентный; П, промежуточный; Ч, чувствительный; (0), означает отсутствие зоны торможения вокруг диска на пластине; (-), не определено.

7.2. Антибактериальная активность КВМЭЗ в отношении штаммов МЛУ *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606

Диаметры зон ингибирования использовали для проверки чувствительности КВМЭЗ, экстрагированного из той же биомассы жира ЛМЧЛ, к противомикробным штаммам бактерий МЛУ на основе теста на дисках. Активность экстракта КВМЭЗ впервые оценивали в отношении стандартных МЛУ-бактерий *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804 в течение 12 ч и 24 ч инкубационного времени. Бактериальные культуры с оптической плотностью 10^8 КОЕ/мл подвергали воздействию различных концентраций 1,25, 2,5, 5, 10, 20 мг/мл экстракта личинок КВМЭЗ, после инкубации размеры ДЗИ определяли путем измерения зоны ингибирования, индуцированной вокруг диска КВМЭЗ, и измерения регистрировали через 12 ч. и 24 ч инкубационного времени (таблица 23, рисунок 39).

Таблица 23. Диаметры зон ингибирования, вызванные КВМЭЗ жира личинок *H. illucens* против патогенных для человека штаммов *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606

Концентрация (мг/мл)	<i>S. aureus</i> ATCC 55804		<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	
	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч
20	19,63±0,79	18,43 ±0,35	19,55±0,34	18,1±0,35
10	16,58±0,51	15,48±0,48	16,9±0,61	14,9±0,61
5	12,68±0,46	11,38±0,39	11,8±0,22	9,7±0,34
2.5	9,83±0,29	8,62±0,43	9,07±0,6	8,55±0,41
1.25	8,66±0,42	7,55±0,34	7,43±0,42	6,87±0,37
Положительный контроль (П/С)	15,75±0,5	14,45±0,46	15,6±0,34	14,35±0,25
Отрицательный контроль (ОК)	НО	НО	НО	НО

Обозначения. НО: не определено, ОК: Отрицательный контроль, П/С: Положительный контроль (пенициллин-стрептомицин) с концентрацией (200 Ед/мл-200 мкг/мл).

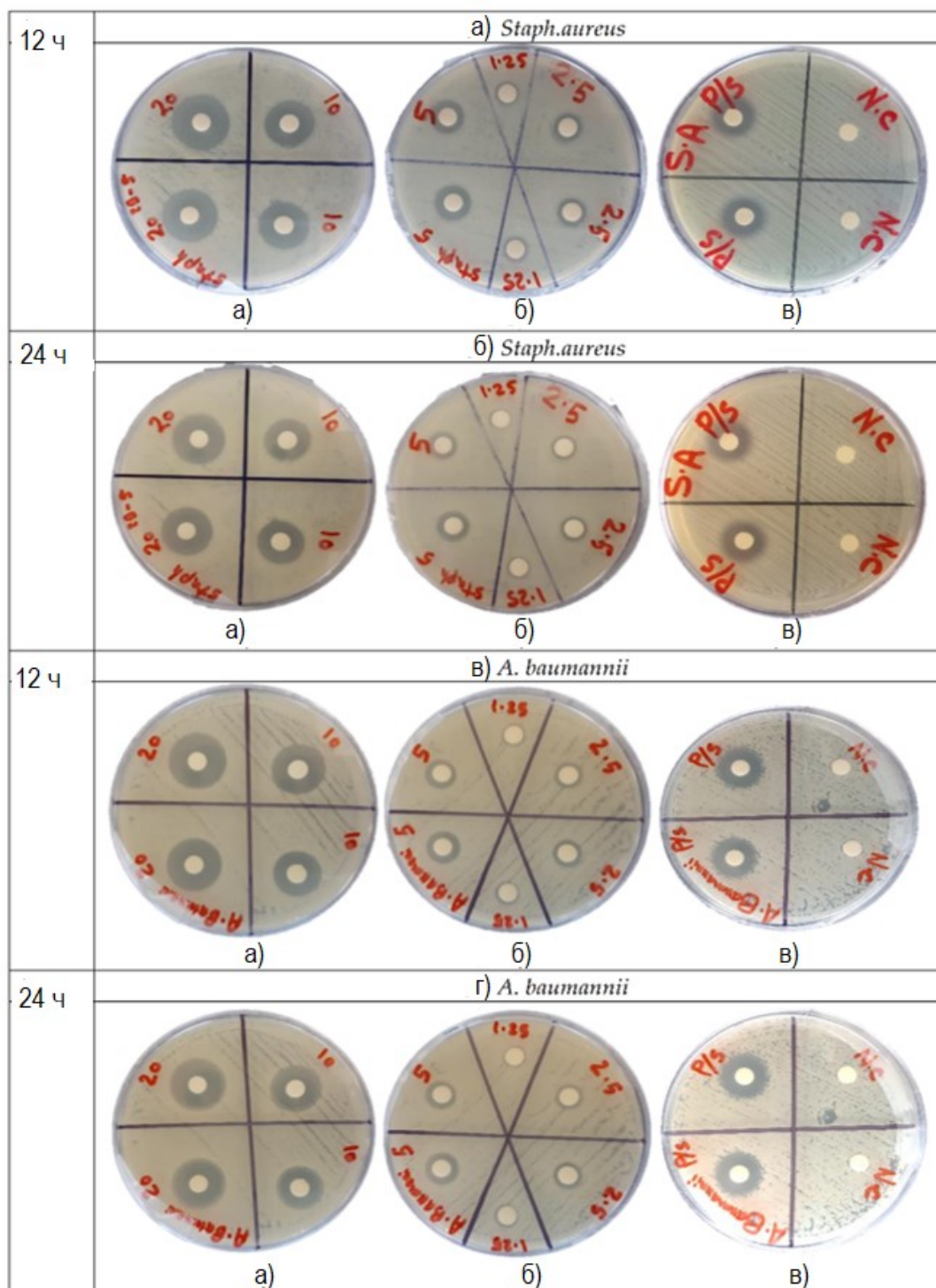


Рисунок 39. Анализ зоны ингибирования для штаммов бактерий человека. Диаметры зон ингибирования измеряли после 12 ч и 24 ч ночной инкубации дисков, загруженных на агар чашки Петри, засеянный (а) штаммами *S. aureus* ATCC 55804, (б) штаммами *A. baumannii* ATCC 19606 с суспензией (1×10^8 КОЕ/мл), (а) Диски загружали с 50 мкл КВМЭЭ с концентрациями 10 и 20 мг/мл; (б) загружали 1,25, 2,5 и 5 мг/мл; (в) 50 мкл (П/С) с концентрацией 200 Ед/мл-200 мкг/мл использовали в качестве положительного контроля и 50 мкл чистого КВМ экстрагирующий раствор использовали в качестве отрицательного контроля (ОК). Все образцы были загружены в дубликатах.

Статистический анализ, проведенный с помощью двухстороннего ANOVA, использовался для анализа сравнения наших результатов с положительным контролем (П/С). Результаты показали, что между средними размерами ДЗИ, полученными при обработке штаммов патогенных бактерий человека КВМЭЗ, наблюдалась значительная разница по сравнению с размерами ДЗИ, вызванными положительным контролем (П/С) ($p \leq 0,05$). Наибольшие размеры зоны ингибирования, вызванные КВМЭЗ, составили $18,43 \pm 0,35$ мм и $18,1 \pm 0,35$ против *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, соответственно, при обработке 20 мг/мл через 24 ч инкубации, по сравнению с положительным контролем (П/С), который регистрировал $14,45 \pm 0,46$ и $14,35 \pm 0,25$ мм, соответственно. Результаты ANOVA показали, что очень значительный ($**** p < 0,0001$) ДЗИ был зарегистрирован против *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, когда они подвергались воздействию концентрации 20 мг/мл экстракта КВМЭЗ, соответственно, по сравнению с контрольным контролем через 12 ч и 24 ч инкубационного времени (рисунок 39). Следует отметить, что бактериальная резистентность увеличивалась со временем для всех протестированных штаммов, о чем свидетельствует снижение значения ДЗИ, когда штаммы бактерий инкубировали в течение 24 ч (рисунки 39, 40). Наши результаты показывают, что КВМЭЗ обладает высокой активностью против МЛУ-бактерий, включая штаммы *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, когда их обрабатывали 10 и 20 мг/мл КВМЭЗ. Все МЛУ-штаммы *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 были ингибированы дозозависимым образом; более того, все тестируемые штаммы бактерий были уничтожены и уничтожены при концентрации КВМЭЗ 20 мг/мл. Активность КВМЭЗ, выделенного из жира ЛМЧЛ, была более эффективной, чем активность масла личинок НІ [320].

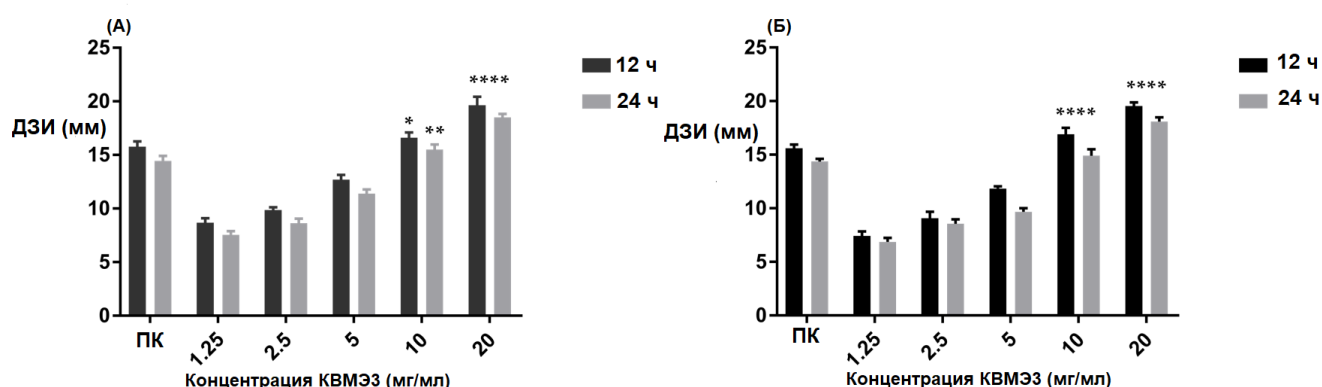


Рисунок 40. Чувствительность КВМЭЗ к противомикробным препаратам против (А) штаммов *S. aureus* ATCC 55804, (Б) штаммов *A. baumannii* ATCC 19606. Штаммы бактерий подвергали воздействию концентраций КВМЭЗ 1,25, 2,5, 5, 10 и 20 мг/мл. Значение ДЗИ измеряли через 12 ч и 24 ч инкубации при 37 °С путем измерения диаметров прозрачных зон, окружающих диски (в мм). Пенициллин - стрептомицин (П/С), используемый в качестве положительного антибактериального контроля. Все значения представлены в виде среднего \pm SD в трех повторах

(n = 3). Данные были проанализированы с помощью двустороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннетта. Данные представлены как значимая разница по сравнению с положительным контролем, и р-значения были (*p=0.013- **** p <0,0001).

7.3. Бактерицидная активность КВМЭЗ в отношении штаммов патогенных бактерий человека с МЛУ

Анализ микродилуции, используемый для определения МИК всех тестируемых штаммов бактерий. Как показано в таблице 24, МИК экстракта КВМЭЗ определяли по отношению к тестируемым бактериям, и все данные регистрировали после 24 ч инкубации.

Таблица 24. Оценка бактерицидной и бактериостатической активности КВМЭЗ

Противомикробное средство	<i>S. aureus</i> ATCC 55804			<i>A. baumannii</i> ATCC 19606		
	МПК (мкг/мл)	МБК (мкг/мл)	МБК/МПК	МПК (мкг/мл)	МБК (мкг/мл)	МБК/МПК
КВМЭЗ	190	380	2,0	380	380	1,0
Пенициллин – стрептомицин (П/С)	19,53	19,53	1,0	9,77	19,53	2,0

Рост бактериальной культуры *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 подавлялся КВМЭЗ жира личинок *H. illucens* с содержанием МПК 190 мкг/мл и 380 мкг/мл соответственно. Ингибирование роста наблюдалось пенициллином-стрептомицином при 9,77 мкг/мл МПК для штамма *A. baumannii* ATCC 19606, в то время как штамм *S. aureus* ATCC 55804 ингибировался при 19,53 мкг/мл. Все тестируемые штаммы обрабатывали различными концентрациями положительного контроля в диапазоне 0,6-78,125 мкг/мл. МБК был идентифицирован как самая низкая концентрация, которая может убить 99,99% протестированных штаммов бактерий после 48 часов инкубации. Те же 380 мкг/мл МБК были определены для штаммов *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, аналогично МБК положительного контроля был зарегистрирован на уровне 19,53 мкг/мл как для штаммов *S. aureus* ATCC 55804, так и для штаммов *A. baumannii* ATCC 19606. Эти результаты демонстрируют, что КВМЭЗ обладает высокой активностью в отношении штаммов МЛУ-бактерий. Бактерицидную активность определяли на основе соотношения МБК/МПК. Соотношение МБК/МПК КВМЭЗ составило два и один против *S. aureus* ATCC 55804 и штамм *A. baumannii* ATCC 19606 соответственно, когда их обрабатывали

различными концентрациями КВМЭЗ (0,38-3,0 мг/мл). С другой стороны, соотношение значений МБК/МПК составило 1,0 и 2,0 для положительного контроля (П/С) против штамма *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 соответственно (таблица 24), когда оба штамма бактерий подвергались воздействию различных концентраций в диапазоне (0,6-78,125 мкг/мл) эталонного антибиотика (П/С). Основываясь на этих результатах, экстракт КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ действовал бактерицидно на грамположительной бактерии (*S. aureus* ATCC 55804) и грамотрицательные бактерии (*A. baumannii* ATCC 19606).

7.4. Влияние КВМЭЗ на кривые роста бактерий

Кинетику роста при ОП₆₀₀ использовали для изучения кривых роста *S. aureus* ATCC 55804 как грамположительных, так и *A. baumannii* ATCC 19606 грамотрицательных бактерий. Кривые роста *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, обработанные различными концентрациями экстракта GAME 3 из жира ЛМЧЛ, показаны на рисунке 41.

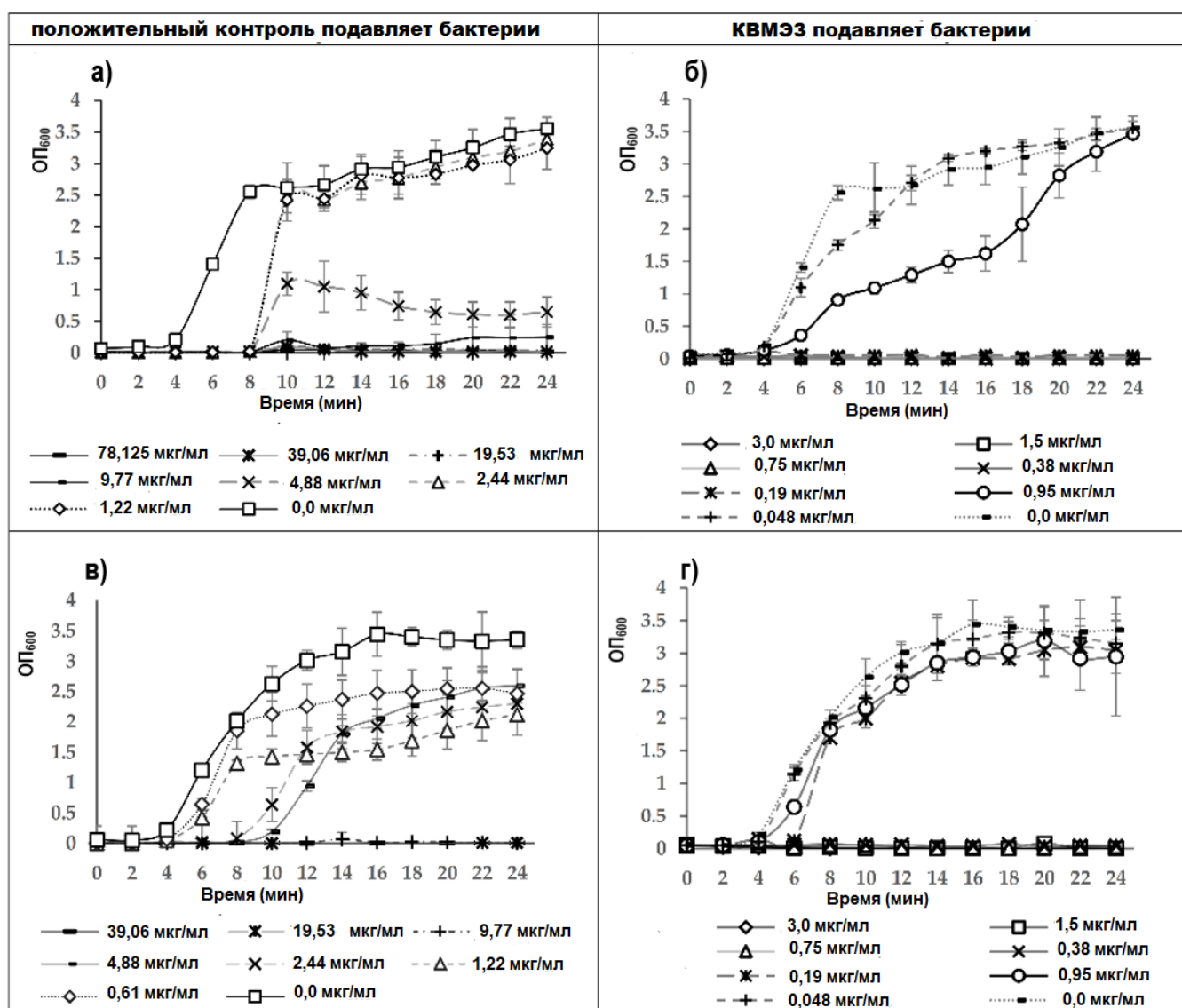


Рисунок 41. Кривые роста (а, б) *S. aureus* ATCC 55804 и (в, г) *A. baumannii* ATCC 19606, обработанных различными концентрациями КВМЭЗ, либо П/С. Каждая точка данных представляет собой среднее значение трех независимых анализов \pm Стандартное отклонение от среднего (SD) и * $p < 0,05$ было значимым.

В присутствии 0,048 и 0,095 мг/мл экстракта КВМЭЗ кривые роста *S. aureus* ATCC 55804 включали три фазы: запаздывающую, экспоненциальную и стационарную фазы. Поскольку плотность бактериальной культуры, включая живые и мертвые клетки, оценивалась с помощью ОП₆₀₀, фаза снижения не могла быть обнаружена на кривых роста штамма *S. aureus* ATCC 55804. Значения МБК экстракта индуцировали ингибирование роста, которое проявлялось в виде прямой линии, параллельной отрицательному контролю. Необработанный *S. aureus* ATCC 55804 быстро достиг экспоненциальной фазы роста, примерно через 4 часа. Концентрация 0,048 мг/мл КВМЭЗ сокращала период логарифмической фазы клеток *S. aureus* ATCC 55804, начиная с 4 ч и заканчивая 16 ч, по сравнению с необработанными клетками, у которых логарифмическая фаза длилась до 22 ч (рисунок 41).

Когда клетки *S. aureus* ATCC 55804 подвергались воздействию 0,095 мг/мл КВМЭЗ, логарифмическая фаза длилась 24 ч до начала стационарной фазы по сравнению с необработанными клетками *S. aureus* ATCC 55804, у которых стационарная фаза начиналась рано, через 22 ч. Кроме того, логарифмическая фаза обработанных бактериальных клеток *S. aureus* ATCC 55804 регистрировала ОП₆₀₀=1,62 \pm 0,27 ед. через 16 ч по сравнению с отрицательным контролем *S. aureus* ATCC 55804, который регистрировал 2,94 \pm 0,26 ед. при том же времени инкубации. Концентрация 0,38 мг/мл КВМЭЗ была предварительно определена как бактерицидная, и фазы роста бактерий не были обнаружены на кривой роста при использовании этой концентрации. Положительный контроль (П/С) задерживал логарифмическую фазу *S. aureus* ATCC 55804, когда его обрабатывали различными концентрациями (1,22-9,77 мкг/мл), поскольку логарифмическая фаза начиналась через 8 ч по сравнению с необработанными бактериями, которые начинались раньше через 4 ч. Самое интересное, что концентрация 4,88 мкг/мл эталонного антибиотика остановила логарифмическую фазу *S. aureus* атаковал клетки 55804 через 10 ч и увеличил фазу снижения, чтобы продолжить с 10 ч до 24 ч. Кроме того, концентрация 9,77 мкг/мл П/С уменьшала время периода логарифмической фазы до 2 ч и увеличивала время стационарной фазы, начиная с 8 ч и продолжая до 24 ч.

Концентрация 0,19 мг/мл КВМЭЗ оказывает значительное влияние на кривую роста клеток *A. baumannii* ATCC 19606, где начало экспоненциальной фазы была отложено на 6 ч с ОП₆₀₀=0,1 \pm 0,021, по сравнению с необработанными клетками *A. baumannii* ATCC 19606, в которых зафиксировано ОП₆₀₀=1,21 \pm 0,08. Концентрация 0,095 мг/мл КВМЭЗ останавливала логарифмическую фазу на 18 ч и превышала фазу снижения, чтобы начаться раньше на 18 ч по

сравнению с отрицательным контролем клеток *A. baumannii* ATCC 19606, где фаза снижения не обнаруживалась до 24 ч. Все концентрации при 3,0, 1,5, 0,75 и 0,38 мг/мл КВМЭЗ ингибировали и уничтожали бактериальный рост *A. baumannii* ATCC 19606. Концентрации 2,44 и 4,88 мкг/мл положительного контроля (П/С) задерживали логарифмическую фазу *A. baumannii* ATCC 19606 до начала на 8 ч по сравнению с необработанными клетками *A. baumannii* ATCC 19606, которая начиналась на 4 ч. Значения оптической плотности варьировались от $0,94 \pm 0,08$ до $1,42 \pm 0,16$ единицы через 12 ч по сравнению с необработанными клетками *A. baumannii* ATCC 19606, которые регистрировали $3,01 \pm 0,17$ единицы при том же времени инкубации. Из всех вышеупомянутых результатов следует, что КВМЭЗ жира ЛМЧЛ оказывает высокозначимое влияние на кривые роста *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 дозозависимым образом. Herndon *et al.*[132] задокументировали, что ЖК оказывают значительное влияние на кривые роста грамотрицательных бактерий.

7.5. Выяснение жизнеспособности бактериальных клеток с помощью оценки МПК50

Тест на жизнеспособность клеток проводили с использованием анализа Аламар синий-АС (англ. АВ). Данные, полученные в результате анализа АВ, показали, что 0,19, 0,38, 0,76 и 1,5 мг/мл КВМЭЗ оказывают значительное антимикробное действие на планктонные формы как *S. aureus* ATCC 55804, так и *A. baumannii* ATCC 19606 ($P < 0,05$ по сравнению с контрольными группами). КВМЭЗ в концентрациях 0,38, 0,76 и 1,5 мг/мл ингибировал и полностью уничтожал рост планктонного *S. aureus* ATCC 55804 более чем на 100% после воздействия этих концентраций, в то время как 0,19 мг/мл показали ингибирование *S. aureus* ATCC 55804 планктонных клеток с 95,9 % по сравнению с необработанными клетками. Концентрации 0,38, 0,76 и 1,5 мг/мл показали значительную эрадикацию планктонных клеток *A. baumannii* ATCC 19606 ($P < 0,05$). В отношении планктонного *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 со скоростью ингибирования (95,9-100%), демонстрирующей тенденцию к КВМЭЗ в зависимости от дозы (рисунок 42).

Наши результаты показали, что концентрация КВМЭЗ, ингибирующая 50% *S. aureus* ATCC 55804 (МПК50), составляла 147 мкг/мл, когда бактериальные клетки подвергались воздействию различных концентраций в диапазоне 0,012-1,5 мг/мл концентраций КВМЭЗ. *A. baumannii* ATCC 19606 был более устойчив к обработке КВМЭЗ, чем *S. aureus* ATCC 55804, демонстрируя 50%-ное ингибирование планктонных клеток *A. baumannii* ATCC 19606 при 222 мкг/мл КВМЭЗ. Значения МПК50 положительного контроля (П/С) составили 9,1 и 6,07 мкг/мл против *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, соответственно, после воздействия различных концентраций (0,6-78,125 мкг/мл) П/С в течение 24 ч (рисунок 42). На основании этих

результатов мы пришли к выводу, что грамотрицательный *A. baumannii* ATCC 19606 был более устойчив к КВМЭЗ, чем грамположительный *S. aureus* ATCC 55804. Наше исследование показало, что экстракт КВМЭЗ жира личинок *H. illucens* проявляет высокую активность в отношении штаммов внутрибольничных бактерий с МЛЮ. Взятые вместе, антимикробные свойства КВМЭЗ, включая МПК, МБК и МПК50, оказывают значительное ингибирование и эрадикацию как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, по сравнению с данными другой литературы [242,378–380].

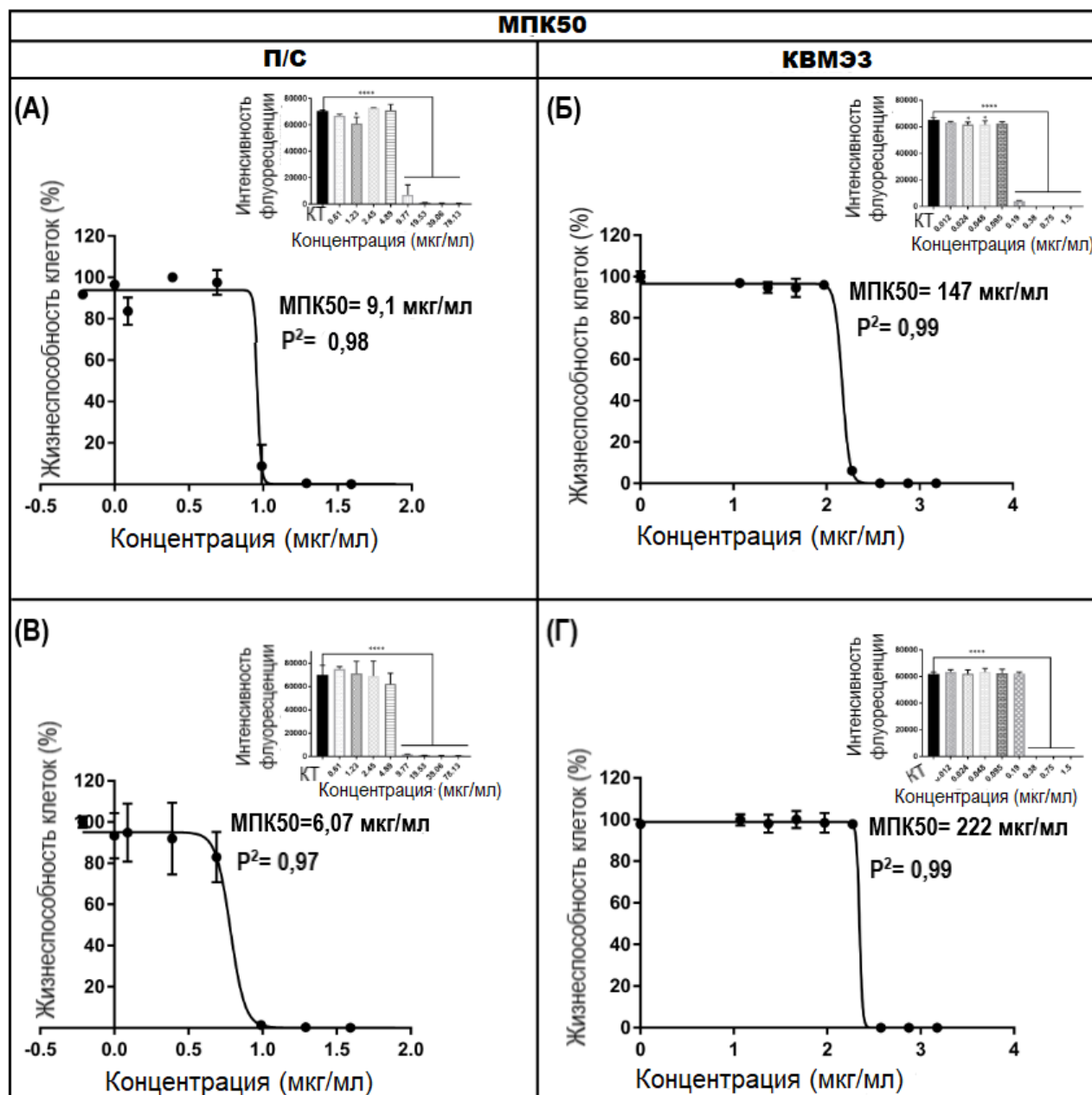


Рисунок 42. Влияние КВМЭЗ из жира личинок НІ на жизнеспособность клеток патогенного для человека *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606. Жизнеспособность клеток (%) определяли с использованием метода Аламар синий. Столбики ошибок указывают на стандартное отклонение % жизнеспособности, полученное в трех отдельных экспериментах,

один из способов, которым обычный тест множественных сравнений ANOVA Даннетта (**** $p < 0,0001$) был значимым. Значения МПК50 рассчитывали на основе снижения концентрации аламарового синего и сравнивали с положительным контролем (П/С). Жизнеспособность патогенных клеток оценивали после 24 ч инкубации. (А, В) обработка П/С; (Б, Г) обработка КВМЭЗ; (А, В) штамм *S. aureus* ATCC 55804; (Б, Г) штамм *A. baumannii* ATCC 19606. Значения МПК50 были рассчитаны с использованием модели нелинейной регрессии Graphpad Prism 7 (GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Значения МПК50 представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов \pm среднее значение ошибки стандартного отклонения (SEM).

7.6. Исследование кривых времени уничтожения

После подтверждения высокой антимикробной активности КВМЭЗ в отношении *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 был проведен анализ кривых времени уничтожения, чтобы выяснить скорость и уровень антибактериальной активности, и отличить бактериостатическую активность от бактерицидной (рисунок 43).

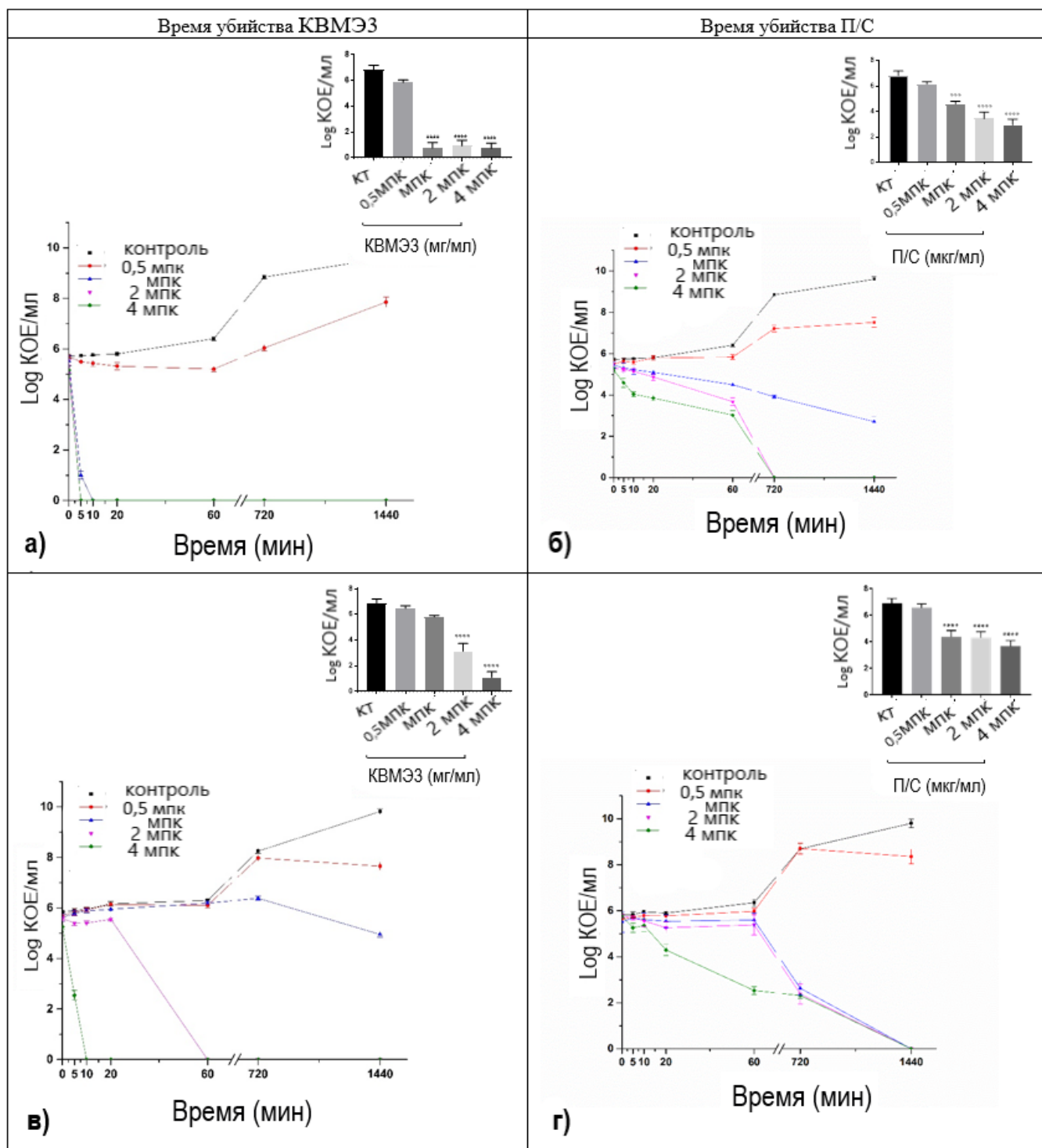


Рисунок 43. Кривые времени уничтожения КВМЭЗ, выделенного из жира личинок НІ, выполненные в бульоне LB при уровнях КВМЭЗ 0,5 МПК, 2 МПК и 4 МПК против (а) *A. baumannii* ATCC 19606, (в) *S. aureus* ATCC 55804, пенициллин-стрептомицин (П/С) (б), против *A. baumannii* ATCC 19606 и (г) против *S. aureus* ATCC 55804. Ночные культуры *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804, доведенные до $\sim 5 \times 10^5$ КОЕ/мл, инкубировали при 37 °С. Жизнеспособность оценивали путем определения КОЕ/мл во время инкубации (0, 5, 10, 20, 60 мин) в течение первого часа после воздействия КВМЭЗ и положительного контроля (П/С) и после 12 ч и 24 ч инкубации. Показаны статистические различия (* $p < 0,05$) между КОЕ, выделенными из обработанных и необработанных культур (непараметрический односторонний ANOVA с

использованием теста множественных сравнений Даннетта). Результаты выражены в виде среднего \pm SEM трех независимых экспериментов.

В контрольной группе количество бактерий увеличилось на 2,41 log₁₀ КОЕ/мл после 12 ч инкубации. Анализ на уничтожение КВМЭЗ и эталонного антибиотика (П/С) проводили параллельно для определения их бактерицидного и бактериостатического действия. КВМЭЗ показал уничтожение МЛУ *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 в зависимости от концентрации. Таким образом, при 2 МПК (0,75 мг/мл), 4 МПК (1,5 мг/мл) КВМЭЗ проявляли быструю бактерицидную активность, способную полностью уничтожить высокий исходный инокулят *A. baumannii* ATCC 19606 ($5,17 \times 10^5$ КОЕ/мл) в течение 5 минут (рисунок 43а). При 0,38 мг/мл наблюдалась более медленная бактерицидная активность при полной эрадикации *A. baumannii* ATCC 19606 после 10 мин инкубационного времени. С другой стороны, штамм *S. aureus* ATCC 55804 был уничтожен после воздействия 4 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ в течение 10 минут. Планктонные клетки *S. aureus* ATCC 55804 были уничтожены после обработки 2 МПК (0,38 мг/мл) в течение 60 минут. В отличие от КВМЭЗ, стандартный антибиотик (П/С) продемонстрировал более медленное снижение логарифма уничтожения после 12 ч воздействия и 24 ч, потраченных на элиминацию клеток *S. aureus* ATCC 55804 при обработке 1, 2 и 4 МПК КВМЭЗ. Быстрая бактерицидная активность КВМЭЗ по сравнению с положительным контролем (П/С) в основном объясняется его способностью более быстро проникать в мембрану *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606. КВМЭЗ с быстрой бактерицидной активностью против МЛУ-штаммов *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804, снижающих потенциальное возникновение бактериальной резистентности и сокращающих продолжительность лечения. Комбинация НЖК, ПНЖК и их глицеридов в экстракте КВМЭЗ была способна убивать и уничтожать *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* за короткий промежуток времени (5-10 мин), по сравнению с другими исследованиями [94,381,382]. Низкие концентрации МПК и высокий бактерицидный эффект КВМЭЗ против *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 побудили нас к более глубокому изучению механизма действия КВМЭЗ, что может объяснить высокую эффективность КВМЭЗ против широкого спектра бактериальных патогенов.

7.7. Влияние солеустойчивости

Соль, такая как хлорид натрия, действует как селективный агент для бактерий и изменяет баланс осмотического равновесия и нарушает проницаемость мембран. Известно, что высокая концентрация соли подавляет различные виды бактерий, но позволяет расти солеустойчивым организмам [383]. Чтобы проверить, снижалась ли антибактериальная активность КВМЭЗ в

присутствии солей, мы обработали *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 различными концентрациями КВМЭЗ при различных концентрациях соли. Потенциал солеустойчивости *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, обработанный КВМЭЗ в концентрациях МПК и 2 МПК, показан на рисунок 44. Доля (%) клеток, которые были способны образовывать колонии в планшетах NA-NaCl по сравнению с планшетами NA (солеустойчивость), представлена на рисунок 44. Когда бактерии предварительно обрабатывали КВМЭЗ, а затем инокулировали на питательные агаровые среды с добавлением NaCl 0%, 2,5%, 5% и 10% концентраций NaCl, значительное уменьшение количества колониеобразующих единиц при 10% NaCl и выживших колоний составило 82,52% для *S. aureus* ATCC 55804, по сравнению с контролем без NaCl (**** $p < 0,0001$) (таблица 25, рисунок 44В). С другой стороны, *A. baumannii* ATCC 19606 не показал роста на NA-пластинах, когда его обрабатывали МПК и 2МПК КВМЭЗ, как показано на рисунке 44А.

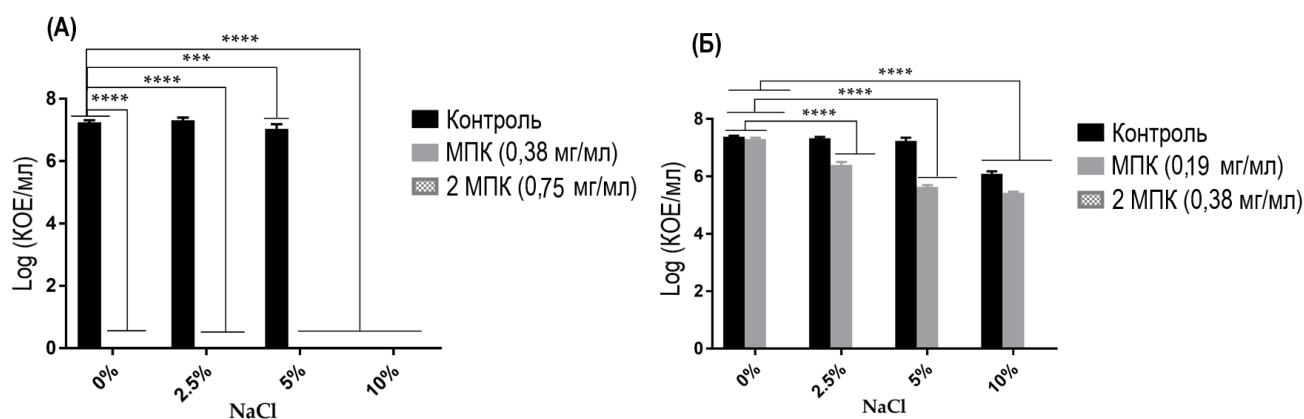


Рисунок 44. Влияние КВМЭЗ, экстрагированного из жира личинок *H. illucens* в концентрациях МПК и 2 МПК, на снижение солеустойчивости *A. baumannii* ATCC 19606 (А) и *S. aureus* ATCC 55804 (Б). Все значения представлены в виде среднего \pm SD в трех экземплярах ($n = 3$). Данные были проанализированы с помощью двустороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннетта. Данные представляли собой значимую разницу по сравнению с контролем без NaCl, и $p < 0,05$ был значимым.

Ни в контрольном, ни в обработанном образце не было обнаружено роста бактерий в NA-планшетах, дополненных 10% NaCl, как для *S. aureus* ATCC 55804, так и для *A. baumannii* ATCC 19606, обработанных 2 МПК (рисунок 44А, Б). Предварительно обработанные пластины NA, дополненные 2,5% и 5%, показали незначительное уменьшение выживших колоний по сравнению с контролем без NaCl для *S. aureus* ATCC 55804 (рисунок 44Б). Все планшеты, обработанные 0,19 мг/мл КВМЭЗ, показали высокую значимую дисперсию, и количество выживших колоний резко уменьшилось (**** $p < 0,0001$), за исключением планшетов NA без NaCl и обработанных МПК КВМЭЗ, показали незначительную дисперсию в выживших колониях по сравнению с необработанным контролем. без NaCl *S. aureus* ATCC 55804 (рисунок 44Б, таблица

26). Выжившие бактерии *A. baumannii* ATCC 19606 значительно уменьшились со 100% до 0% после воздействия 10% NaCl (**** $p < 0,0001$) по сравнению с необработанными бактериальными клетками *A. baumannii* ATCC 19606 после 1 часа инкубации, кроме того, не было обнаружено выживаемости после обработки различными концентрациями (МПК, 2 МПК) КВМЭЗ. Наши результаты показали, что бактериальные клетки, обработанные КВМЭЗ в присутствии различных концентраций NaCl, демонстрировали значительное снижение выживаемости колоний, и эти результаты соответствовали предыдущим исследованиям [384,385].

Таблица 25. Солеустойчивость *S. aureus* ATCC 55804, обработанного МПК и 2 МПК КВМЭЗ на NA-пластинах с 0, 2,5, 5 и 10% NaCl

Обработка	Log КОЕ/мл	Log КОЕ/мл	Log КОЕ/мл	Средний	SD	Выживание
КТ NA без NaCl	7,4	7,34	7,4	7,38	0,251661	100
NA+2,5%	7,3	7,32	7,38	7,333333	0,2	99,36766
NA+5%	7,3	7,1	7,3	7,233333	0,208167	98,01265
NA+10%	6,17	6	6,1	6,09	0,1	82,52033
NA+МПК	7,3	7,25	7,35	7,3	0,251661	98,91599
МПК+2,5%	6,3	6,5	6,41	6,403333	0,503322	86,76603
МПК+5%	5,7	5,58	5,63	5,636667	0,602771	76,3776
МПК+10	5,47	5,43	5,39	5,43	0,251661	73,57724
КТ NA+2 МПК	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 МПК+2,5%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 МПК+5%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 МПК+10 %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Обозначения. КТ - контроль; NA - питательный агар; STD - стандартное отклонение

Таблица 26. Солеустойчивость *A. baumannii* ATCC 19606, обработанного МПК, 2 МПК КВМЭЗ на NA-пластинах с 0, 2,5, 5 и 10% NaCl

Обработка	Log КОЕ/мл	Log КОЕ/мл	Log КОЕ/мл	Средний	SD	Выживание
КТ NA без NaCl	7,26	7,17	7,3	7,24	0,066583	100
NA+2,5%	7,23	7,3	7,4	7,23	0,08544	99,86
NA+5%	7,2	6,9	7	7,03	0,152753	97,1
NA+10%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NA+МПК	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

МПК+2,5%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
МПК+5%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
МПК+10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
КТ NA+2 МПК	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 МПК+2,5%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 МПК+5%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 МПК+10 %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Обозначения. СТ - контроль; NA - питательный агар; SD - стандартное отклонение.

7.8. Оценка целостности мембраны бактериальной клетки

Основываясь на высокой активности КВМЭЗ, мы предположили, что компоненты экстракта КВМЭЗ особенно эффективны при нарушении целостности бактериальной мембраны, вызывая токсичность для бактериальных клеток. Для подтверждения этой гипотезы, мы использовали анализ на окрашивание йодидом пропидия (англ. PI). PI может проникать только в бактериальные клетки с поврежденной мембраной и связывает нуклеиновые кислоты планктонных клеток *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606. Анализ поглощения PI проводили на *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804 использовали в качестве представителей грамотрицательных и грамположительных штаммов соответственно и подвергали воздействию одинаковых концентраций КВМЭЗ (0,19-0,75 мг/мл). КВМЭЗ увеличивал количество PI-позитивных клеток в течение нескольких минут и в зависимости от концентрации (рисунок 45), указывая на то, что КВМЭЗ обладает способностью проникать бактериальные клетки при тех же или даже более низких концентрациях.

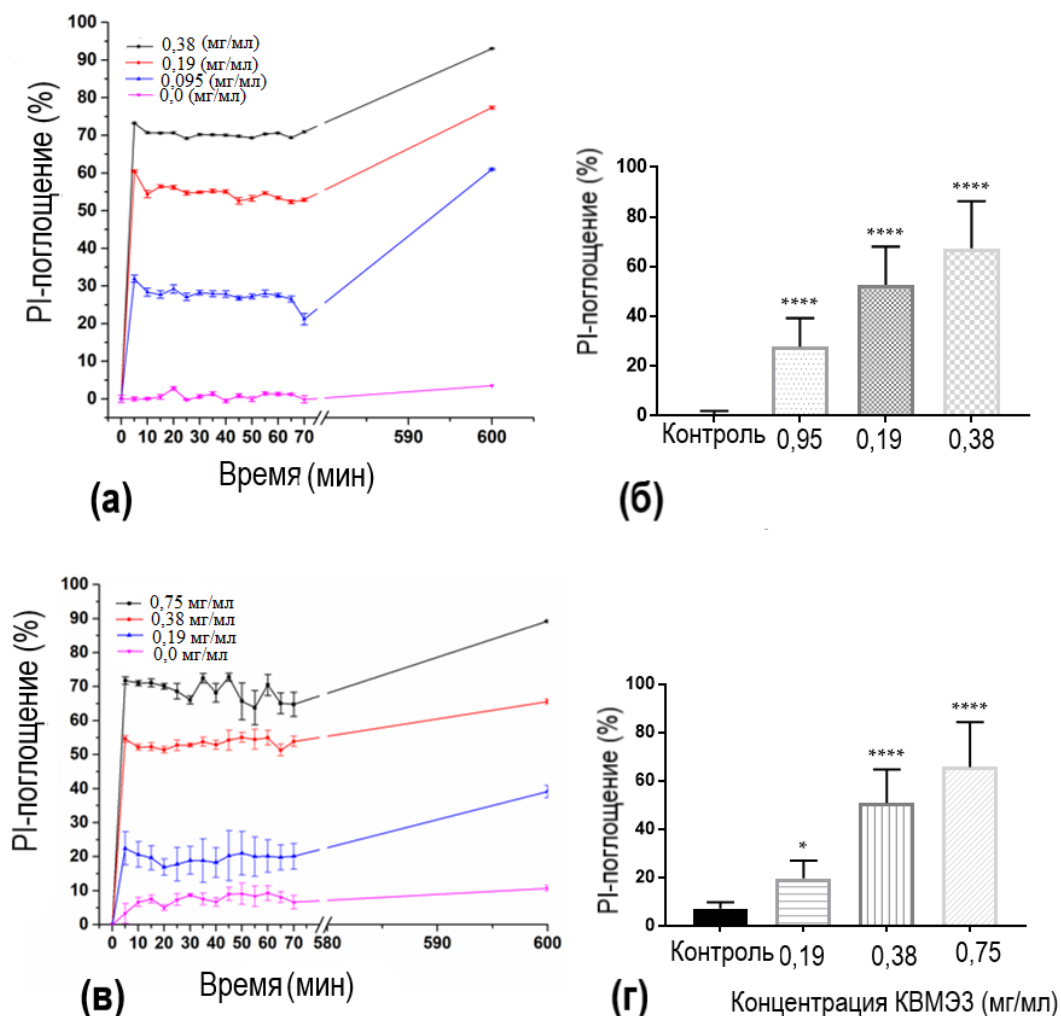


Рисунок 45. Разрушение и проницаемость мембран. Разрушение мембраны, вызванное КВМЭЗ, юбыло обнаружено по поглощению PI при 0,5, 1 и 2 МПК у (а, б) *S. aureus* ATCC 55804 и (в,г) *A. baumannii* ATCC 19606. Анализ проницаемости с помощью КВМЭЗ проводили в смеси (1:1) 20 мм глюкозы и 5 мм НЕРЕС. Бактериальные клетки обрабатывали в течение различного времени инкубации с указанными концентрациями КВМЭЗ. Поглощение PI (%) было рассчитано на основе нормализованных данных, которые представляют собой среднее значение \pm SD трех независимых экспериментов, один из способов, которым обычный тест множественных сравнений ANOVA Даннетта (* $p < 0,014$) был значимым.

КВМЭЗ проникал в более 60% клеток *S. aureus* ATCC 55804 после 5 мин обработки в концентрации МПК (0,19 мг/мл), проницаемость увеличилась и достигла более 70% при 2 МПК (рисунок 45а, б). Еще более высокая степень проницаемости наблюдалась в клетках *S. aureus* ATCC 55804 при 2 МПК, достигая более 90% после 600-минутной инкубации. Аналогично, проницаемость мембраны *A. baumannii* ATCC 19606 увеличивалась при увеличении концентрации КВМЭЗ и времени инкубации. 1 МПК (0,38 мг/мл) и 2 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ проникали на 55% и 70% клеток, соответственно, в течение 5 мин после обработки. Обработка 0,095 мг/мл КВМЭЗ обеспечивала 30% проницаемости клеток *S. aureus* ATCC 55804 в течение 5

мин, в то время как КВМЭЗ 0,19 мг/мл вызывал проницаемость 20% клеток *A. baumannii* ATCC 19606 после 5-минутного воздействия (рисунок 45в, г). Все обработки КВМЭЗ показали очень значительную проницаемость ($p=0,0001$) клеточной мембраны как *S. aureus* ATCC 55804, так и *A. baumannii* ATCC 19606 при разном временном воздействии. Эти результаты ясно показывают, что добавление КВМЭЗ значительно убивает и ингибирует рост *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 и предполагают, что проницаемость клеток стала основным механизмом уничтожения, и эта гипотеза согласуется с несколькими исследованиями [131,333].

7.9. Утечка клеточного цитоплазматического материала

Нуклеиновая кислота и белки в клетке имеют максимальные пики поглощения при 260 нм и 280 нм, соответственно. Другая стратегия определения антимикробного способа действия КВМЭЗ против грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий человека была выполнена на основе анализа высвобождения материалов, поглощающих при длине волны 260 нм из клеток *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, обработанных КВМЭЗ. На рисунок 46 показана утечка нуклеиновой кислоты и белков бактерий, обработанных различными концентрациями КВМЭЗ (МПК, 2 МПК). Значение OP_{260} контрольной группы показало незначительные изменения в течение первого часа, но высвобождение внутриклеточных веществ увеличилось до ($OP_{260}=1$) после 2 часов инкубации из-за разрушения клеток во время промывки, центрифугирования и осмотического воздействия буфера ФБР ($pH=7,2\pm 0,2$) на клеточные мембраны. С другой стороны, незначительные изменения наблюдались в высвобожденном генетическом материале при 280 нм отрицательного контроля во время инкубации. После обработки наблюдалось увеличение оптической плотности фильтратов культуры бактериальных клеток, обработанных 2 МПК КВМЭЗ, примерно более чем в 3 раза по сравнению с отрицательным контролем (рисунок 47А, В). Аналогичный эффект наблюдался, когда клетки *A. baumannii* ATCC 19606 обрабатывали МПК (0,38 мг/мл) и 2 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ в течение того же интервала времени инкубации (рисунок 46А, Б), при этом происходило значительное увеличение ($****P<0,0001$) высвобождаемых материалов, когда *S. aureus* ATCC 55804 подвергались воздействию МПК (0,19 мг/мл) и 2 МПК (0,38 мг/мл) КВМЭЗ в течение первого часа инкубации (рисунок 46В, Г). Наши результаты подтверждают утечку поглощающих материалов с длиной волны 260 и 280 нм из бактериальных клеток обработан МПК и 2 МПК КВМЭЗ. В целом утечка цитоплазматического материала и целостность цитоплазматической мембраны могут быть значительными доказательствами уничтожения бактерий после обработки КВМЭЗ, поэтому в нескольких исследованиях сообщалось об одних и тех же результатах [95,133].

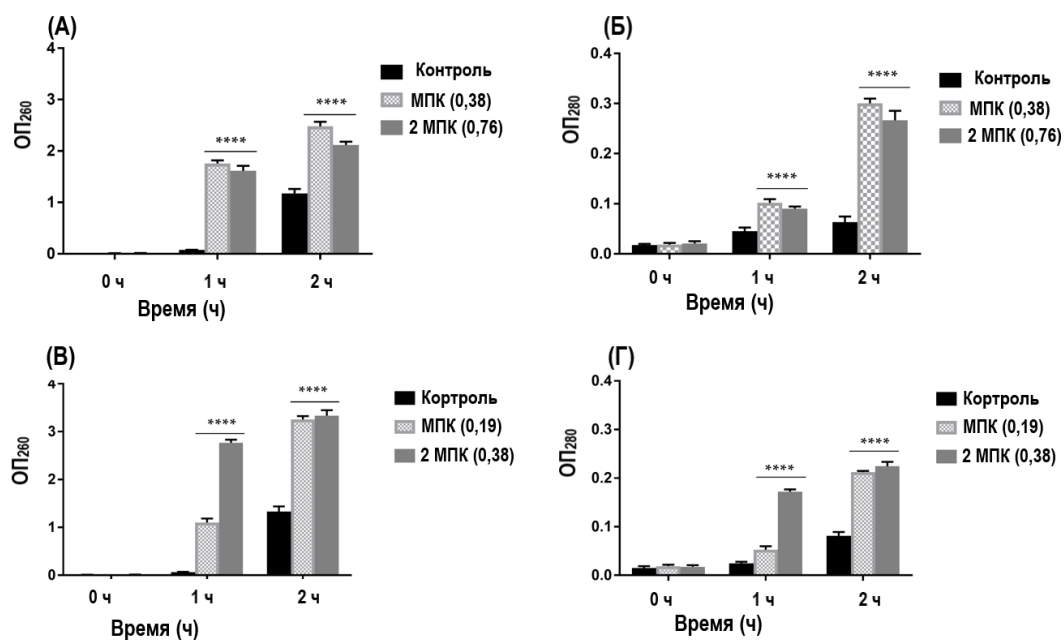


Рисунок 46. Потеря материала, поглощающего при 260 и 280 нм. Клетки *A. baumannii* ATCC 19606 обрабатывали КВМЭЗ (А, Б) при МПК (0,38 мг/мл), 2 МПК (0,75 мг/мл), соответственно. Клетки *S. aureus* ATCC 55804 обрабатывали КВМЭЗ (В, Г) при МПК (0,19 мг/мл), 2 МПК (0,38 мг/мл), соответственно. Данные представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения из трех независимых экспериментов. Звездочки обозначают статистическую значимость ($p < 0,05$) между контролем и обработками (МПК и 2 МПК) КВМЭЗ, полученными с помощью теста Даннетта. ОП: оптическая плотность.

7.10. Внутриклеточная утечка АТФ

Ранние исследования показали, что внутриклеточная АТФ обеспечивает энергию для нормальной физиологической активности микроорганизмов [386,387]. Высококчувствительный набор для обнаружения микробов ViaLight® MDA Plus используется для измерения биолюминесцентного АТФ, который присутствует во всех метаболически активных клетках. На рисунок 47А, В показано, что внутриклеточные концентрации АТФ в клетках *A. baumannii* и *S. aureus* ATCC 55804, обработанных различными концентрациями КВМЭЗ при МПК и 2 МПК, инкубированных в течение 24 ч при 37 °С, были значительно снижены ($P < 0,05$) по сравнению с таковыми в контрольной группе (необработанные бактерии). Кроме того, с увеличением концентрации КВМЭЗ внутриклеточная концентрация АТФ в тестируемых клетках была значительно снижена, а значения p находились в диапазоне (0,0017-0,0001). аналогичным образом, внутриклеточный уровень АТФ как в клетках *A. baumannii* ATCC 19606, так и в клетках *S. aureus* ATCC 55804 был значительно снижен (**** $p < 0,0001$) при обработке различными концентрациями П/С (4,88-39,06 мкг/мл), как видно на рисунок 47Б, Г. Снижение внутриклеточной концентрации АТФ было связано с утечкой внутриклеточного АТФ,

истощением внутриклеточного пула АТФ и рассеиванием компонентов протонной движущей силы [386,388].

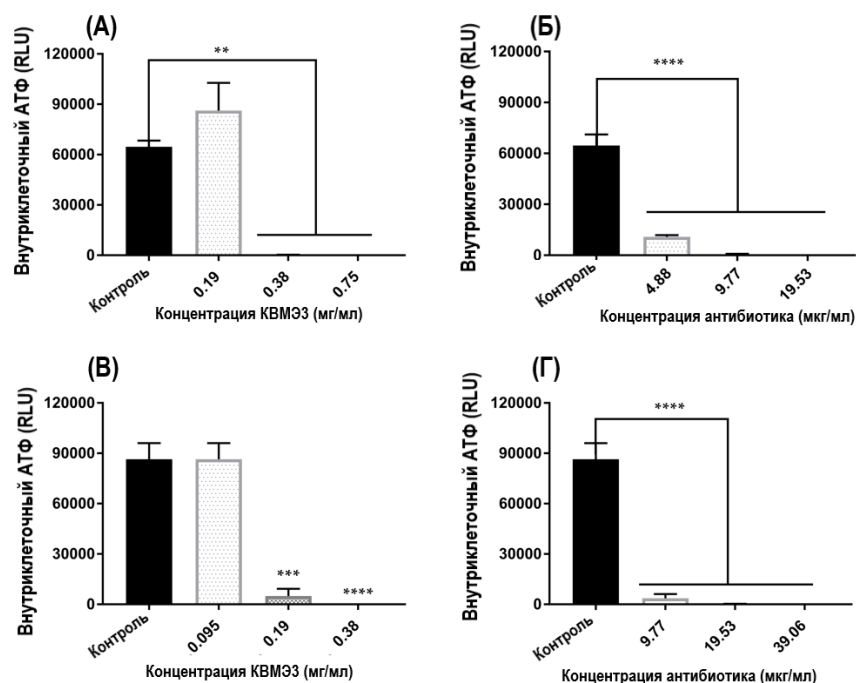


Рисунок 47. Изменение внутриклеточных концентраций АТФ представлено в метаболически активных клетках (А, Б) *A. baumannii* ATCC 19606 и (В, Г) *S. aureus* ATCC 55804. Бактериальные клетки, обработанные 0,0, 0,5, 1 и 2 МПК КВМЭЗ, последовательно экстрагированного из жира личинок НІ (А, В), и бактериальные клетки, обработанные 0,0, 0,5, 1 и 2 МПК положительного контроля (П/С) (Б, Г) с использованием биолюминесцентного метода, основанного на превращении АТФ люциферазой. Значения представляют собой средние значения независимых измерений в трех повторах. Столбики представляют средние значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) из трех независимых экспериментов, значения p были (** $p=0,0017$, *** $p=0,0001$, **** $p<0,0001$).

7.11. Изменение морфологии клеток штаммов *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, обработанных КВМЭЗ

Среди различных методов микроскопии сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) полезна для характеристики морфологии поверхности клетки, в то время как просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) облегчает характеристику морфологии поверхности наряду с плотностью внутренних цитоплазматических компонентов [389]. Чтобы понять механизм действия жирных кислот и их производных в КВМЭЗ из жира личинок НІ, наблюдали морфологические изменения клеток *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804 с использованием СЭМ. Бактериальные клетки обрабатывали различными концентрациями КВМЭЗ, которые составляют 0,5 МПК (рисунок 48б), МПК (рисунок 49в, г, д, е) и 2 МПК (рисунок 48ё, ж, з).

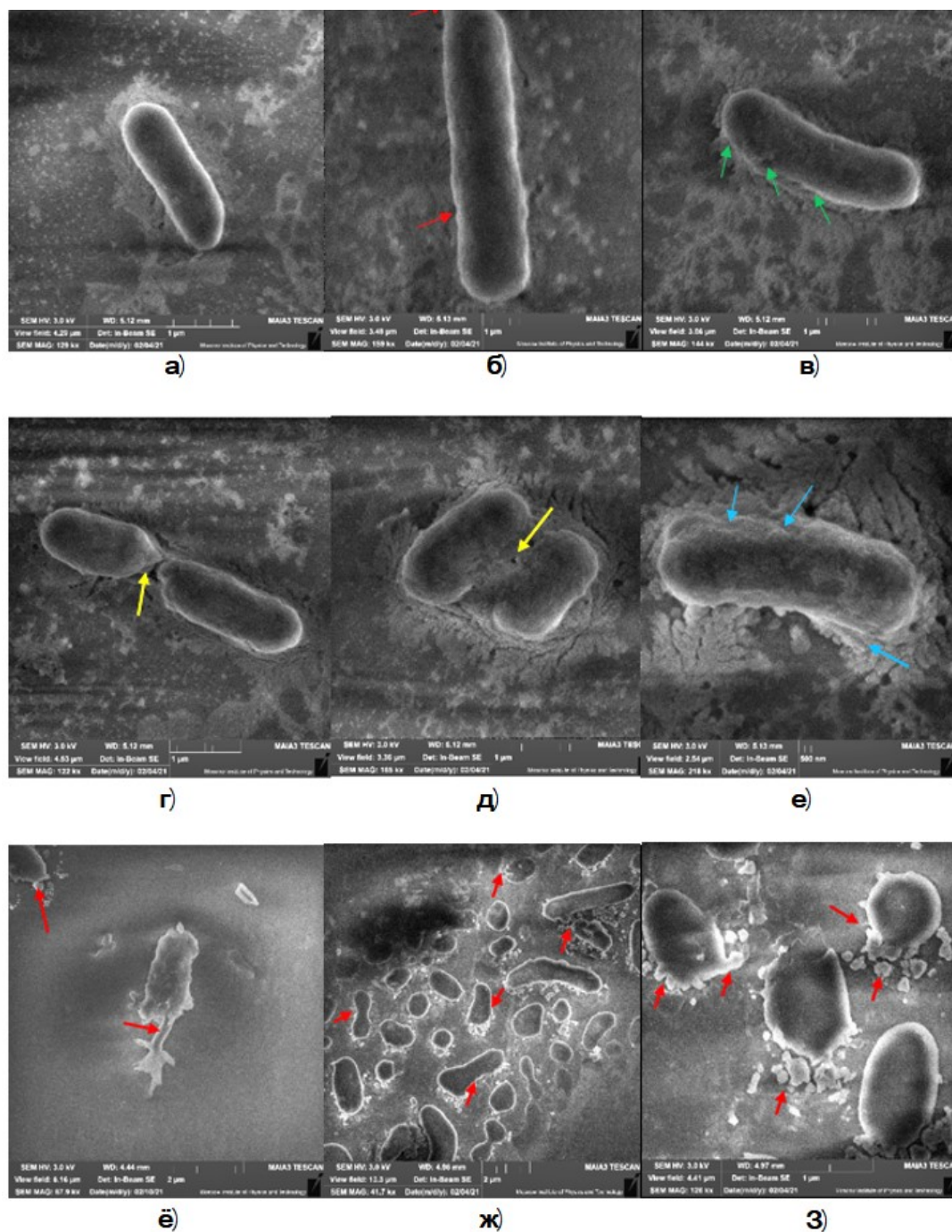


Рисунок 48. Изображения сканирующей электронной микроскопии клеток *A. baumannii* ATCC 19606, обработанных КВМЭЗ при 0,5 МПК, МПК и 2 МПК; (а) Необработанные клетки; (б) Клетки, обработанные 0,5 МПК (0,19 мг/мл) в течение 12 ч; (в, г, д, е) Клетки, обработанные МПК (0,38 мг/мл) в течение 20 мин, (ё, ж, з) Клетки, обработанные 2 МПК (0,75 мг/мл) в течение 10 мин. (а) Клеточная стенка удлиненная, морщинистая и шероховатая (красные стрелки); (б) Клеточная стенка разорвана, шероховатая и деформированная (зеленые стрелки); (г, д) Клеточные стенки разрушены, клеточная перегородка асимметрична (желтые стрелки); (е) Клеточные стенки повреждены и лизированы во многих местах (синие стрелки); и (ё, ж, з) Высвобожденные цитоплазматические компоненты, лизированные клетки, остатки клеток, разрывные изменения и призрачные клетки (красные стрелки).

Необработанный *A. baumannii* ATCC 19606 демонстрирует неповрежденные клеточные стенки с гладкой поверхностью мембраны без каких-либо нарушений в структуре мембраны, симметричную, неискривленную, представленную полную палочковидную морфологию клеток (рисунок 48а). Напротив, после инкубации с КВМЭЗ при низкой концентрации 0,5 МПК (0,19 мг/мл) и инкубации в течение 12 ч стенки клеток казались сморщенными, удлинненными и образовывались небольшие выступы по сравнению с необработанными клетками (рисунок 48б). Согласно данным на рисунках, чем выше концентрация КВМЭЗ, тем сильнее повреждаются клетки *A. baumannii* ATCC 19606. После обработки МПК (0,38 мг/мл) в течение 20 мин при 37 °С клетки демонстрировали шероховатость поверхности и нарушение целостности мембраны с видимыми порами, можно было обнаружить значительную вогнутость и деформацию, расщепления, разрывы и разделение клеток было нарушено после обработки (рисунок 48в, г, д, е). При воздействии 2 МПК (0,76 мг/мл) КВМЭЗ в течение 10 мин наблюдались угнетение, уменьшение в размере, неправильные формы и даже коллапс, и лизис клеток, по сравнению с контролем. Эти результаты указывают на бактерицидный эффект КВМЭЗ, приводящий к быстрому разрушению структуры клеточной поверхности, искажению клеточной стенки (рисунок 48ё, ж, з), где клеточная мембрана была полностью разрушена с образованием внутриклеточного мусора. Обработка клеток *A. baumannii* ATCC 19606 (рисунок 48ё) показывает утечку цитоплазматического материала после обработки 2 МПК КВМЭЗ. В этом состоянии механизм действия КВМЭЗ приводит к потере целостности или функции клеточной мембраны, показывая, что клеточная мембрана была полностью разрушена и присутствие клеточного мусора. В частности, наружные мембраны также полностью разорваны и разрушены, что указывает на гибель *A. baumannii* ATCC 19606 из-за утечки внутриклеточного содержимого.

SEM-изображения клеток *S. aureus* ATCC 55804 получали через 12 ч для МПК, 20 мин для 2 МПК и 10 мин для 4 МПК КВМЭЗ и инкубировали при 37 °С для изучения возможного механизма (механизмов) действия КВМЭЗ жира личинок НІ на бактериальные клетки. Как показано на рисунок 49, поверхности необработанных клеток планктонного *S. aureus* ATCC 55804 были относительно гладкими и непрерывными с хорошей структурной целостностью, неповрежденными и имели полностью сферическую форму (рисунок 49а, б). После обработки *S. aureus* ATCC 55804 с 0,5 МПК КВМЭЗ, очевидно, были обнаружены небольшие поры, клетки все еще гладкие, сферические, неповрежденные, и произошли незначительные морфологические изменения (рисунок 49в). Выступы, подобные тем, которые образовались на поверхности клетки, мембрана стала гофрированной и/или частично набухла, тогда как обработка МПК (0,19 мг/мл) КВМЭЗ в течение 12 ч/мин вызывала серьезные морфологические изменения с поздним делением клеток (рисунок 49в).

Границы клеток были слабыми и нечеткими при обработке бактерицидным 2 МПК (0,38 мг/мл) КВМЭЗ в течение 20 мин, где клетки были разрушены, шероховатые, сморщенные и деформированные, кроме того, после обработки были очевидны неправильные формы, промежутки и вакуоли (рисунок 49д, е, ё). Когда концентрация КВМЭЗ достигала 4 МПК (0,75 мг/мл), в клетках *S. aureus* ATCC 55804 появлялись углубления, пузырьки, коллапс, лизис и нецелая морфология клеток (рисунок 49ё, ж, з). Призрачные клетки появились из-за потери цитоплазматического материала. Эти результаты показали, что КВМЭЗ вызывал явное разрушение клеточной стенки/мембраны *S. aureus* ATCC 55804, указывая на то, что компоненты клеточных стенок/мембран *S. aureus* ATCC 55804 имеют серьезные нарушения с очевидными изменениями. Основываясь на этих результатах, КВМЭЗ взаимодействуют непосредственно со стенками /мембранами микробных клеток, повышая проницаемость мембран и вызывая активную гибель клеток. Значительное количество клеток *S. aureus* ATCC 55804 не смогли сохранить свою овальную форму после обработки 0,75 мг/мл КВМЭЗ. Образование прозрачных клеток с искаженными клеточными стенками указывало на бактерицидное действие КВМЭЗ. Эти результаты показали, что вмешательство в проницаемость клеточных мембран влияет на жизнеспособность клеток. Основываясь на результатах, это явление позволяет предположить, что активные вещества КВМЭЗ из жира личинок НІ могут воздействовать на клеточную мембрану или внеклеточные белки, образуя мелкие поры и приводя к разрушению роста бактериальных клеток.

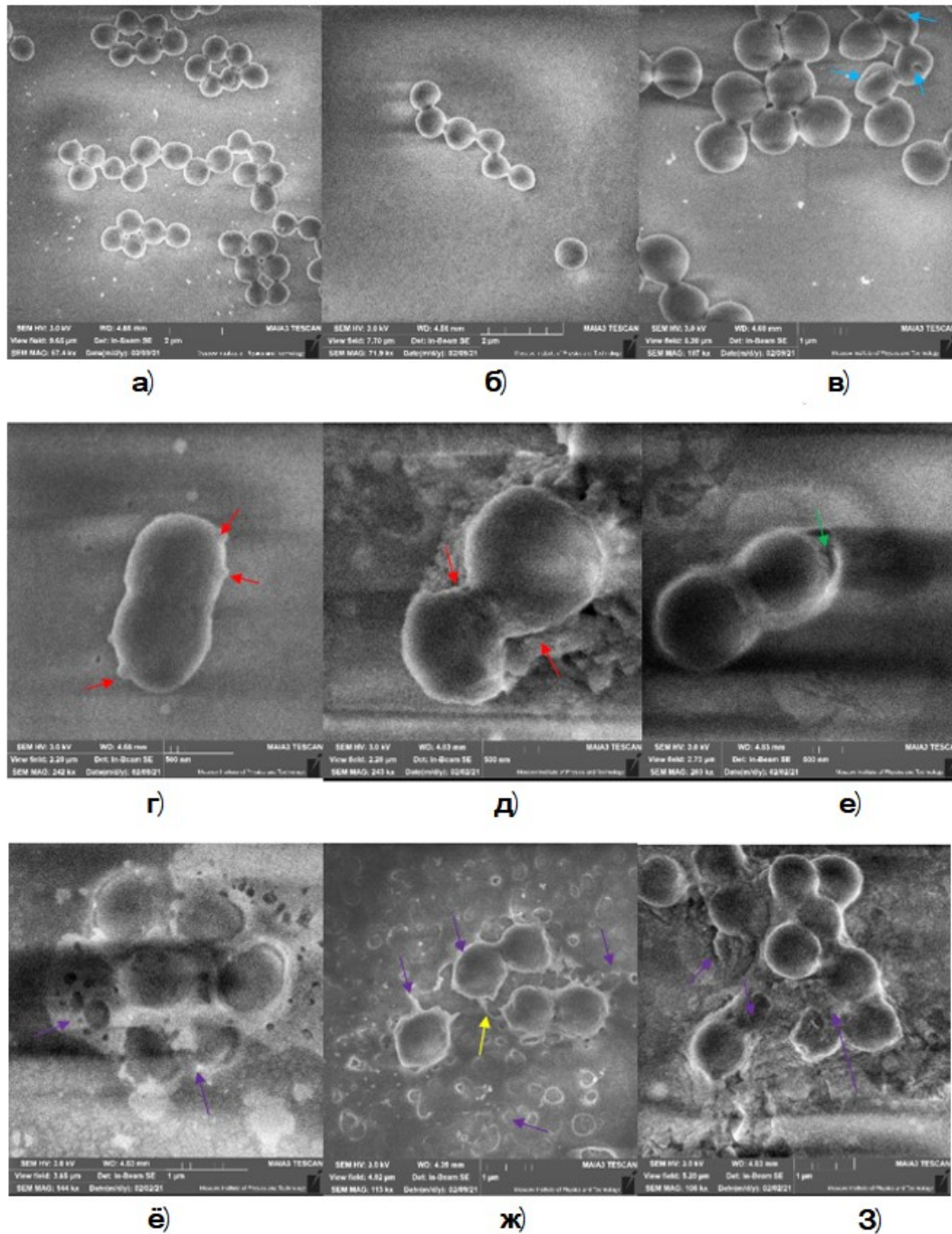


Рисунок 49. СЭМ-изображения клеток *S. aureus* ATCC 55804. (а, б) Необработанный контроль; (в) Обработанный МПК (0,19 мг/мл) в течение 12 ч.; (г, д, е, ё) Обработанный 2 МПК (0,38 мг/мл) КВМЭЗ в течение 20 мин; (ё, ж, з) Обработанный 4 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ в течение 10 мин. Синие стрелки показывают небольшие поры, образовавшиеся внутри клеточной мембраны, красные стрелки указывают на набухание и разрушение клеточной стенки, зеленая стрелка указывает на образование вакуолей или периплазматического пространства и деформацию клеточной стенки, фиолетовые стрелки демонстрируют лизированные клетки, полный разрыв клеточной стенки, клеточный мусор, а желтая стрелка показывает пузырьки и высвобожденные внутриклеточные компартменты.

7.12. Изменения клеточных компарментов штаммов *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 после воздействия КВМЭЗ

Электронная микроскопия является популярным методом измерения для исследования морфологической структуры образцов бактериальных клеток и может быть использована для изучения эффектов антимикробной липидной обработки [389]. Среди различных методов просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) облегчает характеристику морфологии поверхности наряду с плотностью внутренних цитоплазматических компонентов. Чтобы доказать нашу гипотезу о том, что КВМЭЗ рассматривает антибактериальный агент, который разрушает бактериальную клеточную стенку / клеточную мембрану, и подтвердить повреждение *A. baumannii* ATCC 19606 мембраны, микрофотографии ПЭМ, используемые для реализации нашей гипотезы. Микрофотографии ПЭМ показывают, что наружная клеточная мембрана и внутренняя клеточная мембрана необработанных бактерий *A. baumannii* ATCC 19606 оказались неповрежденными бациллами или кокко-бациллами, и клеточные стенки хорошо видны толстыми. Что еще более важно, электронная плотность в цитоплазматической области темнее в области клеточной стенки, что свидетельствует о более толстом и более электронно-плотном пептидогликановом слое (рисунок 50а).

Все концентрации КВМЭЗ оказывают значительное повреждающее действие на бактериальные клетки. После обработки низкой концентрацией КВМЭЗ (0,5 МПК) в течение 12 ч были обнаружены вакуоли (красные стрелки) и пили (желтые стрелки) (рисунок 50б). Воздействие МПК КВМЭЗ в течение 30 мин вызывало сильную конденсацию и потемнение внутриклеточного материала, связанного с внутренним слоем цитоплазматической мембраны, с появлением периплазматических пространств (красные стрелки), вакуоли и пили исчезли (рисунок 50в). Когда *A. baumannii* ATCC 19606, обработанный 2 МПК КВМЭЗ в течение 20 мин, не было четкого различия между внутренней цитоплазматической мембраной и внешней клеточной мембраной (красные стрелки) (рисунок 50г). Цитоплазматический материал конденсировался в центре клетки (желтая стрелка), наблюдался распад мембраны бактерий на полярных концах, а также утечка цитоплазмы, разрыв клеточной стенки и мембраны во многих местах (синие стрелки) (рисунок 50д). Клеточные нуклеоиды (область с низкой электронной плотностью) были разрушены, а цитоплазматический матрикс (область с высокой электронной плотностью) был разреженным. Кроме того, нерегулярные морфологические структуры, в том числе уменьшение размера клеток, деформация клеточной стенки, разрыв клеточной мембраны (черные стрелки), высокая электронная плотность цитоплазматических материалов конденсировалась в центре обработанных клеток (рисунок 50е), кроме того, лизированные клетки, клеточная стенка и клеточный мусор были обнаружены после обработка 2 МПК КВМЭЗ.

Воздействие высокой концентрации 4 МПК (1,5 мг/мл) КВМЭЗ в течение 10 мин приводило к полной деградации клеточной стенки, также наблюдалась гетерогенная плотность цитоплазмы и структура растворенной клеточной мембраны (красные стрелки). Кроме того, прозрачные клетки появлялись после утечки цитоплазматического материала (рисунок 50ё, ж). Эти результаты подтверждают быструю реакцию между КВМЭЗ и клеточной стенкой (пептидогликаном), клеточной мембраной и цитоплазматическим материалом *A. baumannii* ATCC 19606. Эти данные подтверждают разрушение мембраны *A. baumannii* ATCC 19606 КВМЭЗ через повреждение клеточной стенки, проницаемость мембраны и утечку цитоплазматического материала.

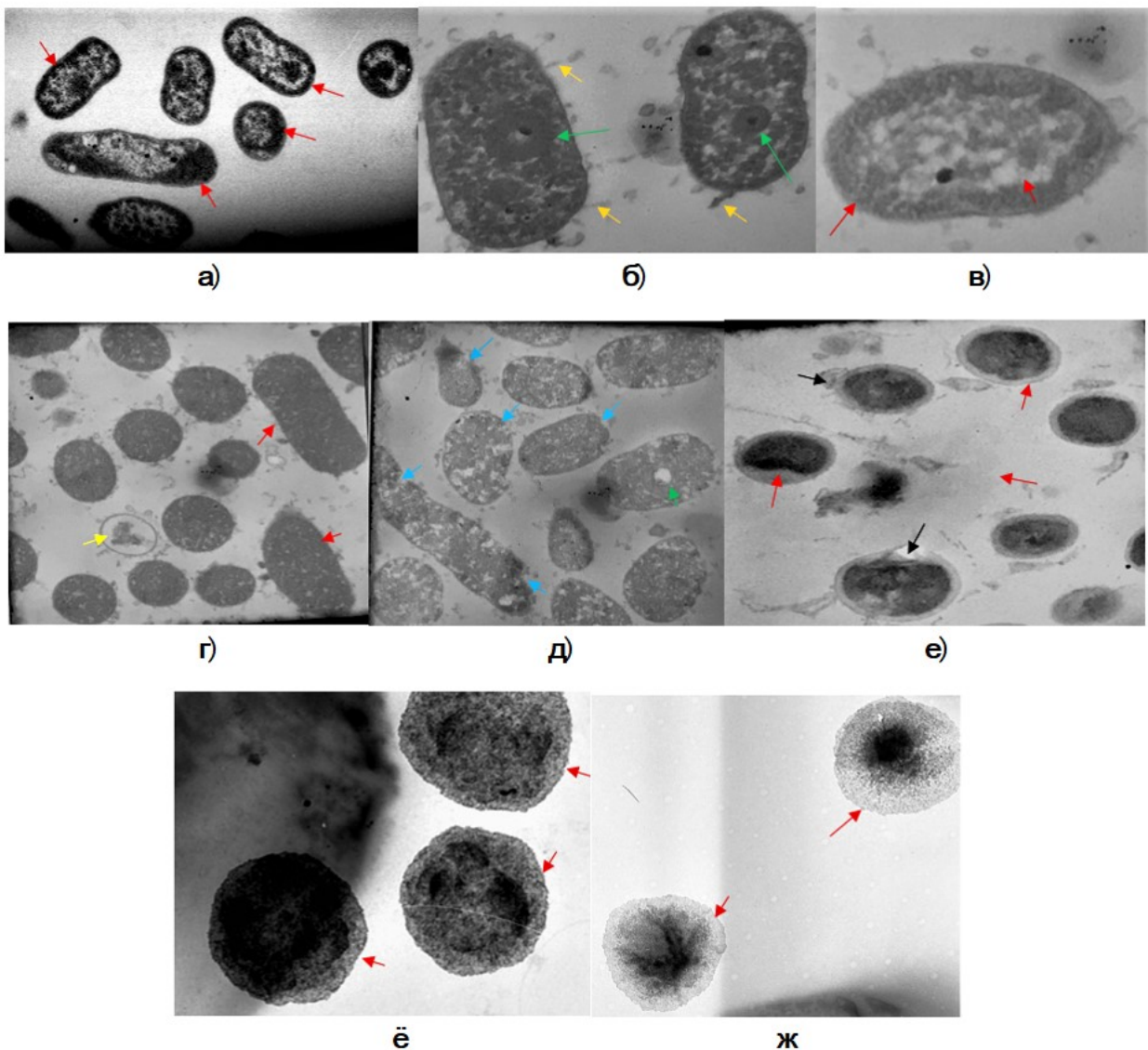


Рисунок 50. ПЭМ -микрофотографии *A. baumannii* ATCC 19606, взвешенные либо в ФБР (а), либо подвергнутые воздействию КВМЭЗ (б-ж). Неповрежденная толстая клеточная стенка и клеточная мембрана присутствовали в контрольном образце. (а) Клеточная стенка или клеточная мембрана казались более тонкими, и образовались БОЛЬШИЕ вакуоли после обработки 0,5 МПК КВМЭЗ (0,19 мг/мл) в течение 12 ч. (б) Истощение и усадка цитоплазматического материала после обработки МПК (0,38 мг/мл) в течение 1 ч (в, г, д, е). Деградация клеточной стенки и

клеточной мембраны, в дополнение к хрупкому цитоплазматическому материалу из-за воздействия 2 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ в течение 30 мин. (ё, ж) Полное разложение и потеря клеточных стенок и клеточной мембраны после воздействия на бактерии 4 МПК (1,5 мг/мл) в течение 10 мин.

Повреждение мембраны было очевидно на рисунке 51, где с помощью ПЭМ можно наблюдать гомогенные клеточные стенки с неповрежденной цитоплазмой. Необработанные клетки *S. aureus* ATCC 55804, выращенные в культуральной среде, демонстрировали типичные черты морфологии стафилококков: гладкие округлые клетки с неповрежденной толстой оболочкой клеточной стенки и четко очерченными мембранами (рисунок 51а).

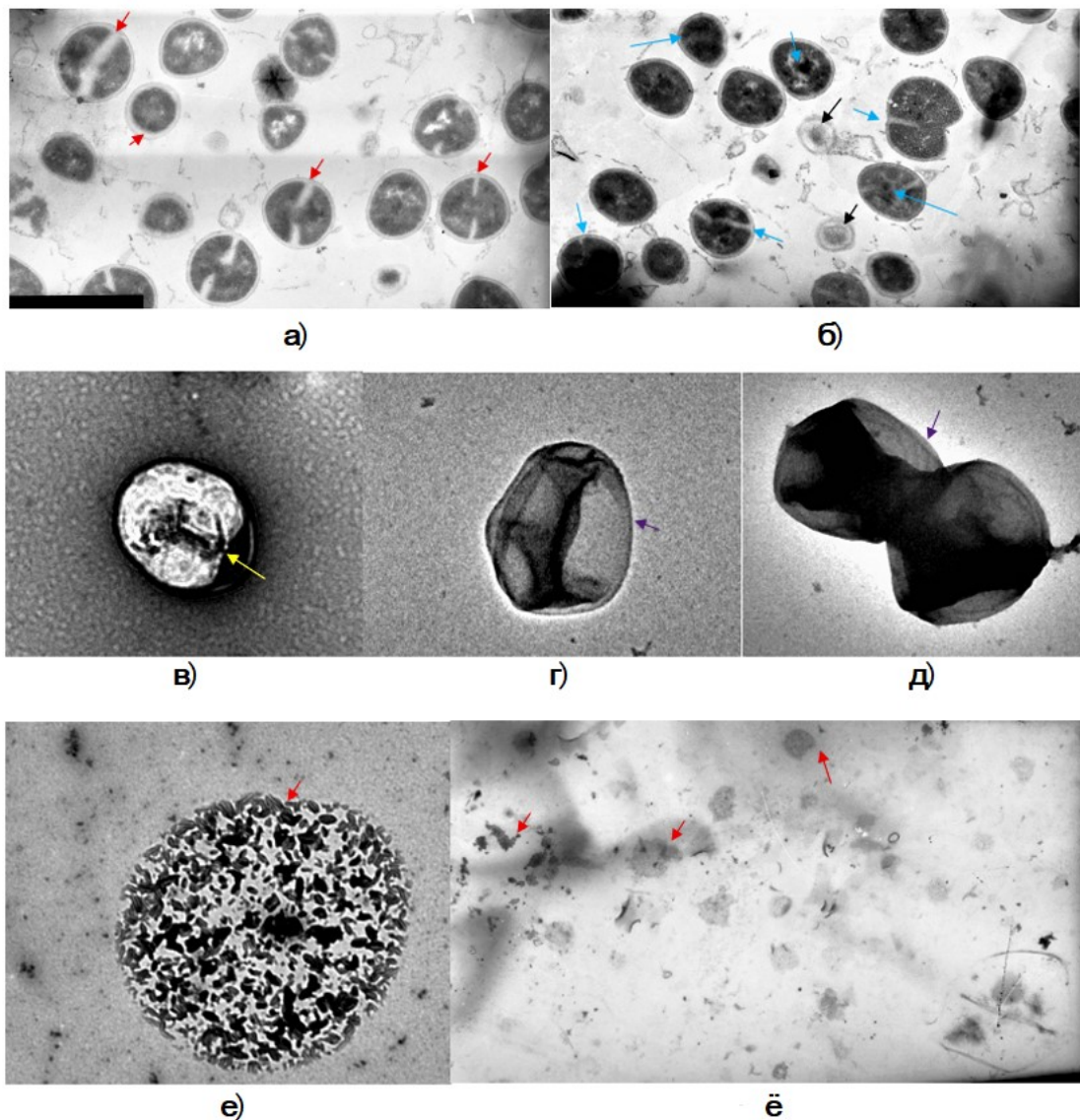


Рисунок 51. ПЭМ-микрофотографии необработанного и обработанного *S. aureus* ATCC 55804. Необработанные клетки выглядели круглыми и неповрежденными, с четко очерченной клеточной мембраной, а красные стрелки указывают на неповрежденные перегородки (а). Было замечено начало разделения (красные стрелки) и образование поперечных стенок. После обработки в течение 12 ч МПК (0,19 мг/мл) КВМЭЗ; (б, в) Клетки оказались деформированными

со сморщенным цитоплазматическим материалом и абберантными перегородками; (г, д) Клетки появились с телами, не заключенными в мембраны (обозначены фиолетовыми стрелками) после обработки 2 МПК (0,38 мг/мл) в течение 30 мин. Также были отмечены некоторые лизированные клетки (е), а также нулевые клетки (ё) также были отмечены после обработки 4 МПК (0,75 мг/мл) в течение 10 мин.

Цитозоль демонстрировал однородную электронную плотность, и обычно наблюдались пролиферирующие клетки с центральной перегородкой (красные стрелки). Клеточная стенка показала двухслойную структуру, состоящую из внешнего слоя, который показывает сильно окрашенную волокнистую поверхность, внутреннюю тонкую зону с электронной плотностью. Микрофотографии необработанных клеток *S. aureus* ATCC 55804 показали хорошо выраженное образование перегородок, происходящее преимущественно через середину клетки, разделяя клетку на две симметричные дочерние клетки (рисунок 51а). Клетки демонстрировали более диффузные перегородки и преимущественно более “асимметричные” клеточные деления (синие стрелки), обработка МПК КВМЭЗ в течение 12 ч воздействовала на клетки, у которых была шероховатая поверхность, а электронная плотность в цитоплазме казалась темной, неоднородной (рисунок 51б). Клетки казались аномальными со сморщенными стенками, увеличенными, периплазматические пространства (черные стрелки) появлялись в маленьких клетках со сморщенной цитоплазмой (рисунок 51б) по сравнению с необработанными клетками. Цитоплазматический материал конденсировался в центре клетки с наличием большой полости (желтая стрелка) в передней части клетки, появлением прозрачной зоны и сохранением внешней клеточной мембраны (рисунок 51в). После обработки 2 МПК КВМЭЗ в течение 20 мин клеточная стенка и клеточная мембрана казались неразличимыми или ослабленными, кроме того, темные уплотненные цитоплазматические компартменты казались неоднородными, сморщенными и сморщенными клеточными стенками (фиолетовые стрелки), как показано на рисунке 51г, д. Воздействие высокой концентрации 4 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ в течение 10 мин привело к полной деградации клеточной стенки и клеточной мембраны, диссоциации внутриклеточного содержимого с шероховатой поверхностью (рисунок 51е), кроме того, клетки *S. aureus* ATCC 55804 полностью лизировались, и были обнаружены остатки клеток (рисунок 51ё). Результаты, приведенные выше, дополнительно подтвердили процесс распада внутренней структуры клетки, который согласуется с результатами исследования ПЭМ, и между КВМЭЗ и мембраной клеточной стенки произошла очевидная реакция, которая привела к распаду и гибели клеток.

7.13. Атомно-силовая микроскопия

Для изучения возможного воздействия КВМЭЗ на грамположительные (*S. aureus* ATCC 55804) и грамотрицательные (*A. baumannii* ATCC 19606) клетки на микро- или наноуровнях мы

использовали атомно-силовую микроскопию (АСМ). АСМ - чрезвычайно полезный инструмент для анализа двух- и трехмерной топографии биологических образцов, включая бактерии. Этот метод позволяет охарактеризовать поверхность бактериальных клеток, получая топографические изображения с высоким разрешением при минимальном разрушении образца [390]. В этом исследовании мы проанализировали и выявили морфологические характеристики *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 на основе измерения рассчитанных семи выбранных параметров, включая длину (мкм), ширину (мкм), высоту (нм), шероховатость поверхности (нм), RMS (среднеквадратичное значение) поверхности, эксцесс (Ska) и асимметрию (Ssk).

7.13.1. АСМ изображения контрольных клеток *S. aureus* ATCC 55804

АСМ изображения свежеприготовленного необработанного *S. aureus* ATCC 55804 показывают типичную сферическую или кокковую морфологию с относительно гладкой поверхностью и без изменений (рисунок 52а). Клеточная стенка и клеточная мембрана казались неповрежденными, без разрывов или больших пор (черные стрелки) (рисунок 52а, г).

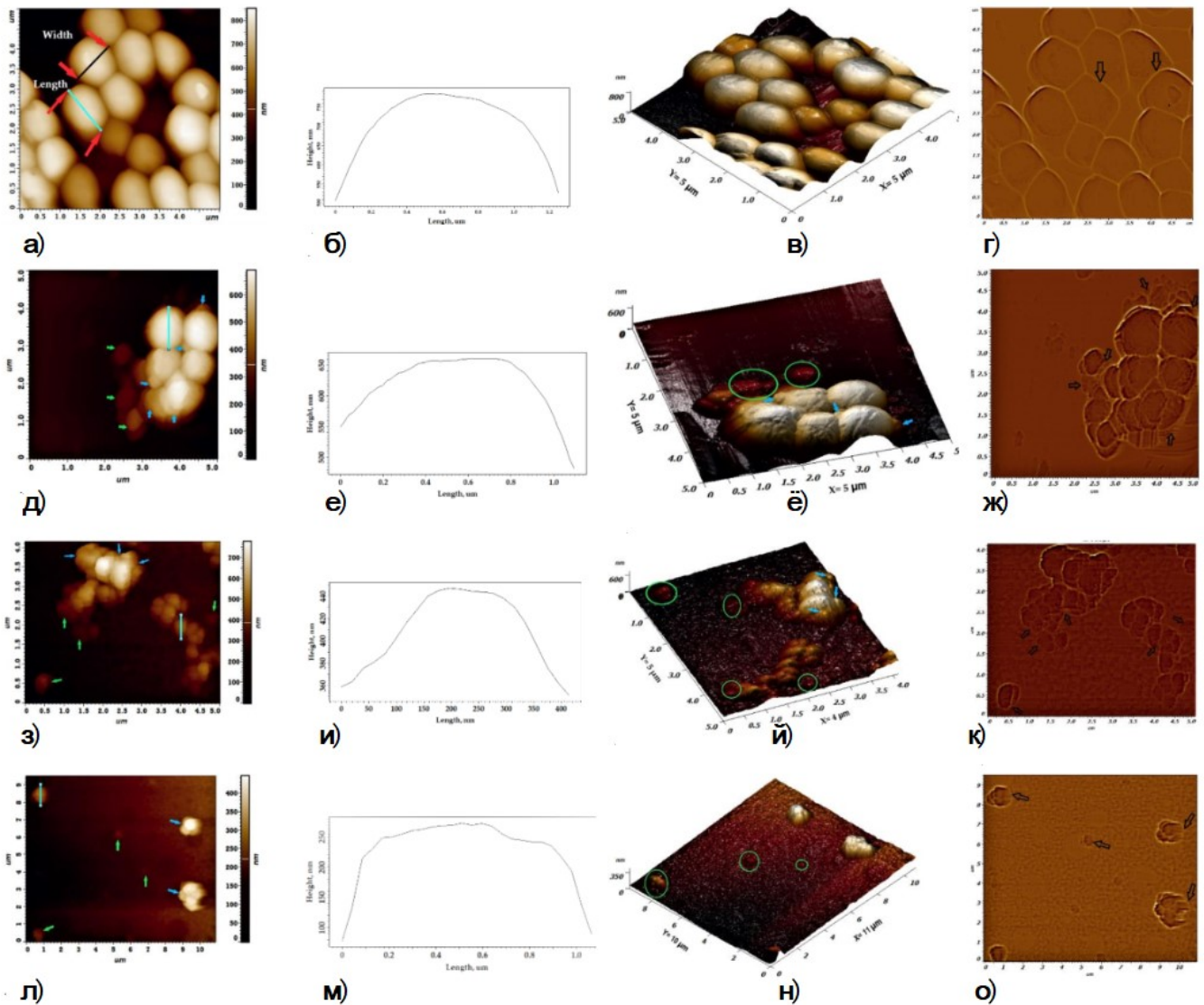


Рисунок 52. Морфологические изменения, индуцированные КВМЭЗ против бактерий *S. aureus* ATCC 55804. Контроль (а), обработанный микрофон (д) в течение 12 ч, 2 микрофона в течение 20 мин (з и с 4 микрофонами в течение 10 мин (л) КВМЭЗ: топография (а, д, з, л), поперечное сечение (б, е, и, м) и трехмерное (в, ё, й, н), улучшение краев, лапласианские изображения 5×5 (г, ж, к, о). Синие стрелки показывают разрушение клеточных стенок, зеленые стрелки указывают на лизированные клетки и остатки клеток на 2D изображениях на левой панели. Зеленые циклы указывают на лизированные клетки на 3D-изображениях, а прозрачные черные стрелки указывают на повреждение клеточных стенок *S. aureus* ATCC 55804 при воздействии различных концентраций (0,19-0,75 мг/мл) КВМЭЗ на правой панели.

7.13.2. АСМ изображения клеток *S. aureus* ATCC 55804, обработанных КВМЭЗ в низких концентрациях

При низкой концентрации КВМЭЗ (0,19 мг/мл) наблюдаются начальные морфологические изменения, заключающиеся в появлении углублений на поверхности некоторых клеток, а также

некоторых мицеллообразных структур или остатков внешней мембраны, обнаруженных вокруг клеток или закрепленных на них (синие стрелки (рисунок 52д). Это указывает на разрушение внешней мембраны бактерий, вероятно, из-за прямого взаимодействия и связывания КВМЭЗ с пептидогликаном, который специфичен для грамположительных бактерий. Это воздействие, возможно, повредило внешнюю мембрану, обнажив таким образом пептидогликановую стенку под ней. Бактериальные культуры, обработанные МПК (0,19 мг/мл) КВМЭЗ и исследованные методом АСМ, показали признаки морфологических изменений, вызванных на мембранном уровне действием жирных кислот, которые были наиболее распространены в КВМЭЗ (рисунок 52д).

АСМ изображения позволили нам определить и сравнить размеры бактериальных клеток, а также предоставили подробную информацию о топологии поверхности клеток. Значительное уменьшение (**** $p < 0,0001$) наблюдалось в размере клеток *S. aureus* ATCC 55804, когда его обрабатывали 0,19 мг/мл КВМЭЗ в течение 12 ч. Длина и ширина клеток обработанных клеток *S. aureus* составляли $0,94 \pm 0,19$ мкм и $0,89 \pm 0,17$ мкм, соответственно, по сравнению с необработанными клетками *S. aureus* ATCC 55804, которые составляли $1,1 \pm 0,16$ мкм и $1,15 \pm 0,14$ мкм соответственно (таблица 27, рисунок 53А, Б).

Таблица 27. Морфологические характеристики штаммов *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606 при различных концентрациях КВМЭЗ

Напря жение	КВМЭЗ (мг/мл)	Длина (мкм)	Ширина (мкм)	Высота (нм)	Ra (нм)	Ska	Ssk	RMS (нм)
<i>S. aureus</i> ATCC 55804	Контроль	$1,1 \pm 0,16$	$1,15 \pm 0,14$	$762,9 \pm 99,1$	$43,17 \pm 9,1$	$15,15 \pm 4,3$	$3,3 \pm 0,67$	$126,4 \pm 22,6$
	0,19	$0,94 \pm 0,19$	$0,89 \pm 0,17$	$566,5 \pm 90,9$	$56,91 \pm 13,8$	$4,39 \pm 0,59$	$1,37 \pm 0,19$	$178,03 \pm 25,6$
	0,38	$0,76 \pm 0,22$	$0,68 \pm 0,17$	$476,9 \pm 32,4$	$73,9 \pm 15,2$	$6,6 \pm 2,64$	$1,81 \pm 0,58$	$126,03 \pm 44,1$
	0,75	$0,59 \pm 0,18$	$0,55 \pm 0,15$	$238,8 \pm 66,5$	$16,59 \pm 5,7$	$17,97 \pm 2,95$	$3,64 \pm 0,78$	$43,67 \pm 15$
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	Контроль	$2,18 \pm 0,32$	$1,15 \pm 0,19$	$776,6 \pm 128,3$	$19,9 \pm 5,6$	$4,12 \pm 2,9$	$1,17 \pm 0,56$	$102,8 \pm 18,5$
	0,19	$2,7 \pm 1,4$	$0,93 \pm 0,18$	$471,2 \pm 108,6$	$49,2 \pm 18,9$	$8,37 \pm 4,2$	$2,29 \pm 0,69$	$143,08 \pm 35,6$
	0,38	$2,08 \pm 0,6$	$0,82 \pm 0,21$	$383 \pm 81,1$	$56,4 \pm 13,8$	$11,9 \pm 6,4$	$2,9 \pm 0,87$	$109,8 \pm 16$
	0,75	$1,59 \pm 0,67$	$0,79 \pm 0,34$	$162,4 \pm 75,4$	$14,4 \pm 4,4$	$6,7 \pm 3,8$	$1,59 \pm 0,66$	$104,1 \pm 40,2$

Обозначения. Ra; Среднее значение шероховатости, Ska; среднее значение эксцесса, Ssk; Асимметрия поверхности, RMS; среднеквадратичное значение поверхностей

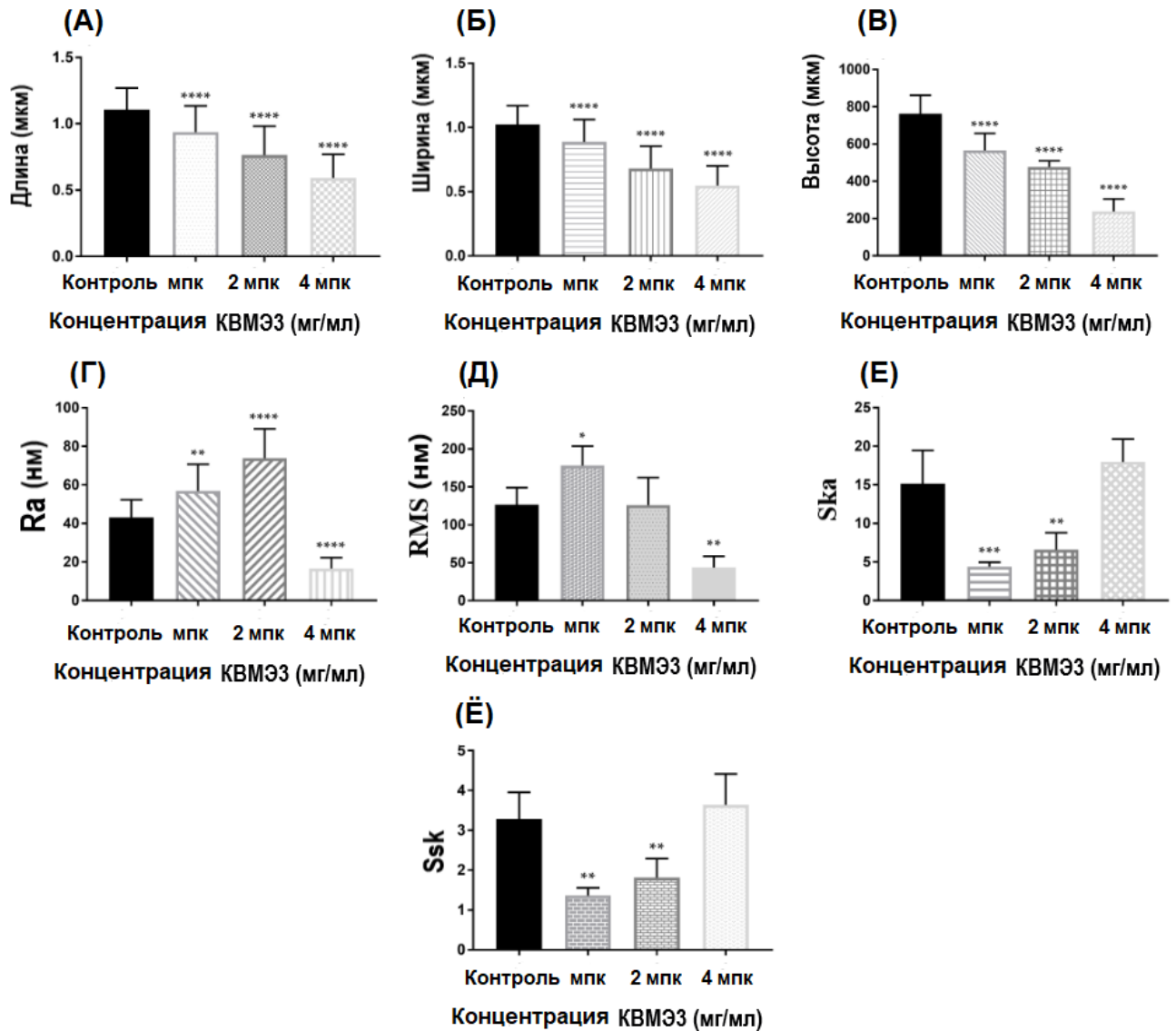


Рисунок 53. Размеры клеток длина (А), ширина (Б), высота (В), шероховатость (Г), среднееквадратичное значение поверхности-RMS (Д), Эксцесс-Ska (Е), асимметрия-Ssk (Ё) измерения по нескольким изображениям контрольных бактерий ($n = 50$) и 0,19 мг/мл (МПК), 0,38 мг/мл (2 МПК) и 0,75 мг/мл (4 МПК) АWMEЗ, выделенного из бактерий, обработанных жиром личинок НI ($n = 50$). Все изображения АСМ, полученные в двух независимых экспериментах, для построения всех графиков использовалась Graph Pad Prism и односторонний тест множественных сравнений ANOVA Даннетта для статистического сравнения между обработанным и необработанным (контрольным) *S. aureus* ATCC 55804, все данные представляют собой среднее \pm стандартное отклонение, значение p (* $p=0.041$ -**** $p < 0,0001$).

Некоторые жидкости и остатки были обнаружены вокруг апикального конца клеток, как показано на рисунок 52д; кроме того, клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана были повреждены и разрушены во многих местах (рисунок 52ж). При более высоких концентрациях КВМЭЗ (0,38 и 0,75 мг/мл) возмущения, наблюдаемые на поверхности клеток, становятся более очевидными. Бактерии сильно пострадали (рисунок 52з, и, й), где клеточная стенка и клеточная мембрана были разрушены и разрушены, клетки лизировались, образовался клеточный мусор.

Наблюдалось значительное уменьшение (**** $p < 0,0001$) размера клеток (рисунок 53), где длина и ширина клеток уменьшились до $0,76 \pm 0,22$ мкм и $0,68 \pm 0,17$ мкм соответственно, когда клетки *S. aureus* ATCC 55804 подвергали воздействию 2 МПК (0,38 мг/мл) КВМЭЗ (таблица 27, рисунок 53А, Б). В других случаях коллапс всей ячейки был очевиден и наблюдался на 2D, 3D изображениях (рисунок 52з, й, к). Изображения поверхности клеток с высоким разрешением показывают серьезные повреждения, вызванные воздействием КВМЭЗ (рисунок 52з, й, к, л, н, о), по сравнению с таковыми у контрольных клеток (рисунок 52а, в, г). Высокая усадка (0,47 %, 53%) в длину и ширину ($0,59 \pm 0,18$, $0,55 \pm 0,15$ мкм), соответственно, клеток *S. aureus* ATCC 55804, когда их подвергали воздействию 4 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ.

7.13.3. Уменьшение размеров клеток *S. aureus* ATCC 55804 при обработке КВМЭЗ

Изменения в размерах бактерий определяли количественно путем измерения по изображениям топографии АСМ (рисунок 52б, е, и, м) высоты клеток в двух независимых экспериментах ($n=30$ бактерий на обработку). Высоту оценивали по профилю поперечного сечения для каждой зарегистрированной бактерии. Анализ распределения по высоте показывает, что средняя высота необработанных клеток *S. aureus* ATCC 55804 составляла $762,9 \pm 99,1$ нм (рисунок 52б). Однако при обработке КВМЭЗ наблюдалось значительное снижение (**** $p < 0,0001$) до $566,5 \pm 90,9$ нм, когда бактериальные клетки обрабатывали МПК (0,19 мг/мл) в течение 12 ч (рисунок 52б, 54В). При высоких концентрациях КВМЭЗ было зарегистрировано значительное снижение значений высоты ($476,9 \pm 32,4$ нм, $238,8 \pm 66,5$ нм), и наблюдалось значительное (**** $p < 0,0001$), когда клетки *S. aureus* ATCC 55804 обрабатывали 2 МПК (0,38 мг/мл) и 4 МПК (0,75 мг/мл), соответственно, по сравнению с контрольной группой (таблица 27, рисунок 52и, м и рисунок 53В). Коэффициент сжатия для обработанного *S. aureus* ATCC 55804 рассчитывали на основе значений высоты, зарегистрированных 27,1 %, 37,5% и 68,7%, когда бактериальные клетки подвергались воздействию 0,19 мг/мл, 38 мг/мл и 0,75 мг/мл КВМЭЗ, соответственно. Следовательно, уменьшение высоты, наблюдаемое в клетках *S. aureus* ATCC 55804 после обработки КВМЭЗ, предполагает уменьшение объема клеток *S. aureus* ATCC 55804, вероятно, из-за потери внутриклеточных материалов при коллапсе клеток.

7.13.4. Изменение значений шероховатости бактериальной поверхности (Ra) и среднеквадратичного значения шероховатости (RMS)

АСМ-изображения показали, что значения шероховатости поверхности обработанных клеток *S. aureus* ATCC 55804 увеличились, где средняя шероховатость для необработанных клеток составляет $43,17 \pm 9,1$ нм для *S. aureus* ATCC 55804. Когда клетки *S. aureus* ATCC 55804 подвергались воздействию 0,19 мг/мл и 0,38 мг/мл, наблюдалось значительное (** $p = 0,001$)

увеличение средней шероховатости поверхности МЛУ *S. aureus* ATCC 55804 в 1,3 раза больше, чем у необработанных бактерий, и составило $56,91 \pm 13,8$ нм (таблица 27, рисунок 53Г). Наиболее значительное ($****p < 0,0001$) увеличение шероховатости поверхности размер клеток *S. aureus* ATCC 55804 составлял $73,9 \pm 15,2$ нм, что в 1,7 раза больше, чем у необработанных клеток, когда *S. aureus* ATCC 55804 подвергался воздействию 0,38 мг/мл КВМЭЗ. Резко значимое уменьшение ($****p < 0,0001$) шероховатости зарегистрировано $16,59 \pm 5,7$ нм с усадкой (62%), когда клетки *S. aureus* ATCC 55804 обрабатывали 0,75 мг/мл КВМЭЗ в течение 10 мин (таблица 27, рисунок 53Г). Изображения с высоким разрешением *S. aureus* ATCC 55804 показывают высокие нарушения и большие изменения в морфологических характеристиках обработанного клетки *S. aureus* ATCC 55804 (рисунок 52д, ё, ж, з, й, к, л, н, о) по сравнению с контрольной группой (рисунок 52а, в, г). Шероховатость поверхности бактерий, называемая среднеквадратичным значением, была еще одним количественным параметром для оценки морфологии поверхности клеток. Результаты, приведенные в таблице 27, показали, что тестируемые бактерии имели шероховатую поверхность. Для контрольной группы клеток штамма *S. aureus* ATCC 55804 его среднее среднеквадратичное значение шероховатости составило $126,4 \pm 22,6$ нм, в то время как значительное увеличение ($*p = 0,041$) среднеквадратичного показателя наблюдалось, когда клетки *S. aureus* ATCC 55804 обрабатывали МПК (0,19 мг/мл) КВМЭЗ и составило $178,03 \pm 25,6$ нм. При самой высокой концентрации 4 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ наблюдалось значительное снижение ($*p = 0,0019$) значения среднеквадратичного значения до $43,67 \pm 15$ нм, в то время как не было зарегистрировано существенной разницы, когда клетки подвергались воздействию 2 МПК (0,38 мг/мл) по сравнению с необработанными бактериальными клетками (таблица 27, рисунок 53Д).

7.13.5. Изменения морфологических параметров клеток *S. aureus* ATCC 55804

Параметры формы бактерий, включая Ska и Ssk, где эти параметры способны определять неровности формы. Параметр эксцесса Ska был значительно снижен ($***p = 0,0005$, $**p = 0,003$), когда клетки *S. aureus* ATCC 55804 обрабатывали МПК (0,19 мг/мл) и 2 МПК (0,38 мг/мл) КВМЭЗ, и составил $4,39 \pm 0,59$, $6,6 \pm 2,64$, соответственно. по сравнению с необработанными клетками ($15,15 \pm 4,3$). В отличие от этого, когда клетки *S. aureus* ATCC 55804 обрабатывали высокой концентрацией 4 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ, статистическая разница для Ska ($17,97 \pm 2,95$) не была значимой по сравнению с контрольной группой (таблица 27, рисунок 53Е). Кроме того, асимметрия Ssk резко снизилась и зафиксировала ($1,37 \pm 0,19$, $1,81 \pm 0,58$), когда бактериальные клетки *S. aureus* ATCC 55804 подвергались воздействию 0,19 мг/мл и 0,38 мг/мл соответственно с хорошей достоверной разницей ($**p = 0,001$, $**p = 0,009$), соответственно, по сравнению с необработанными клетками ($3,3 \pm 0,67$). С другой стороны, не наблюдалось существенной разницы в параметре Ssk ($3,64 \pm 0,78$), когда клетки *S. aureus* ATCC 55804

обрабатывали 0,75 мг/мл в течение 10 минут, по сравнению с контрольной группой (таблица 27, рисунок 53Е). Полное повреждение клеток наблюдается при самой высокой концентрации анализируемого КВМЭЗ (75 мг/мл) (рисунок 52л, н, о). Изображения поверхности клеток с высоким разрешением показывают серьезные повреждения, вызванные воздействием КВМЭЗ (рисунок 52л, н, о) по сравнению с таковыми у контрольных клеток (рисунок 52а, в, г). Таким образом, топографические изменения, наблюдаемые в бактериальных клетках, становятся более выраженными по мере увеличения концентрации КВМЭЗ, используемого при обработке. Кроме того, в качестве фона вокруг необработанных клеток наблюдается чистая поверхность подложки (рисунок 52а, в, г). Напротив, небольшие гранулы или агрегаты наблюдаются на полимерной подложке вблизи клеток, обработанных КВМЭЗ (рисунок 52з, й, к, л, н, о). Такое поведение сопровождается повреждением целостности клеток, что позволяет предположить, что агрегаты могут соответствовать внутриклеточному содержимому и/или клеточному мусору.

7.13.6. АСМ изображения контрольных клеток *A. baumannii* ATCC 19606

Морфологические эффекты КВМЭЗ на грамотрицательный штамм *A. baumannii* ATCC 19606 представлены в таблице 27 и на рисунке 54.

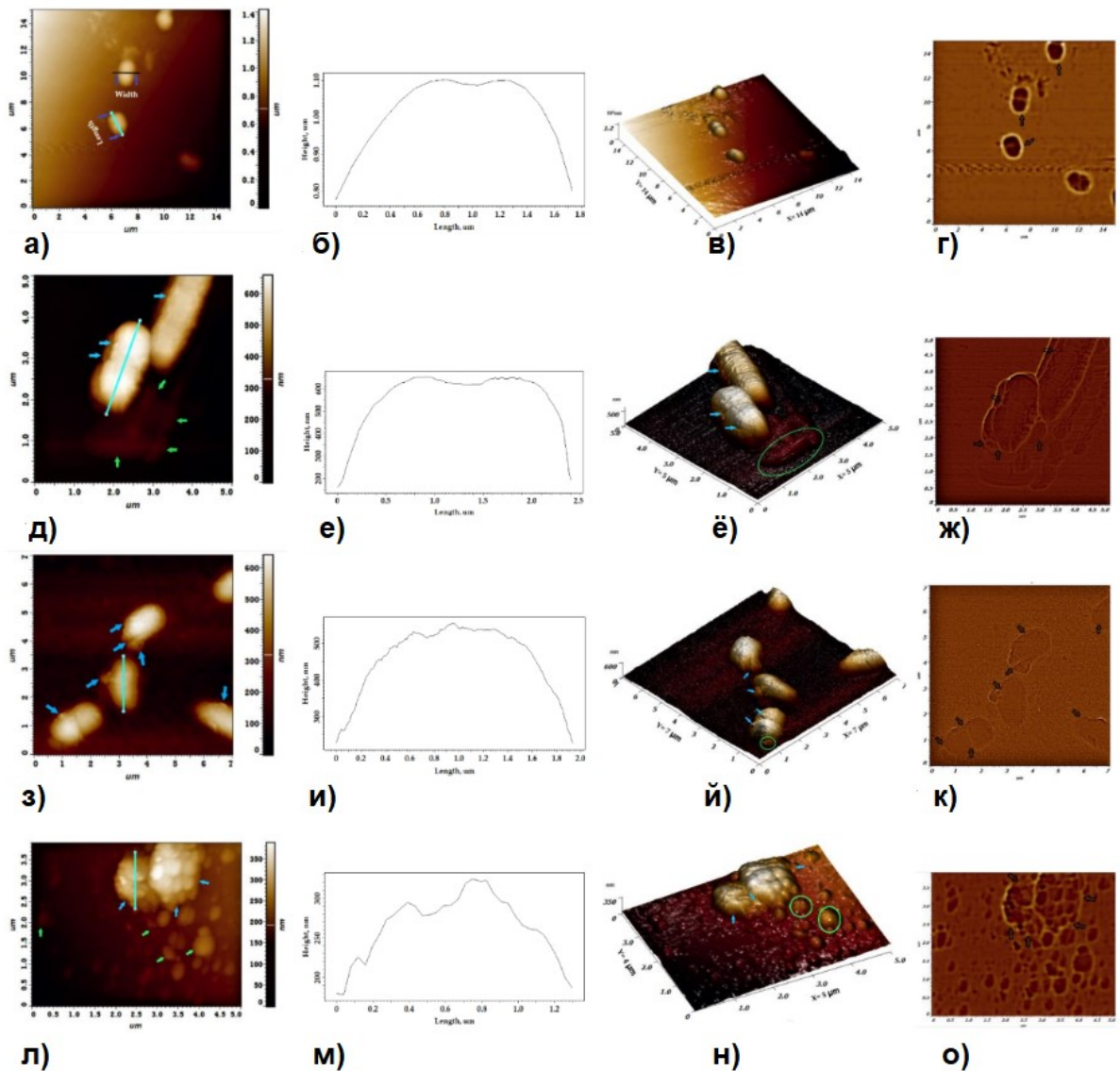


Рисунок 54. Репрезентативные изображения морфологических изменений, вызванных КВМЭЗ против бактерий *A. baumannii* ATCC 19606. Контроль (а), обработанный 0,5 МПК (0,19 мг/мл) в течение 12 ч (д), МПК (0,38 мг/мл) в течение 20 мин (з) и 2 МПК (0,75 мг/мл) в течение 10 мин (м) КВМЭЗ: топография (а, д, з, л), поперечное сечение (б, е, и, м) и трехмерное (в, ё, й, н), улучшение краев, лапласианские изображения 5×5 (г, ж, к, о). Синие стрелки показывают разрушение клеточных стенок, зеленые стрелки указывают на лизированные клетки и остатки клеток на 2D изображениях на левой панели. Зеленые циклы указывают на лизированные клетки на 3D-изображениях, а прозрачные черные стрелки указывают на повреждение клеточных стенок *A. baumannii* ATCC 19606, подвергшихся воздействию различных концентраций (0,19-1,5 мг/мл) КВМЭЗ на правой панели. Явления удлинения клеток очевидны, когда клетки *A. baumannii* ATCC 19606 подвергались воздействию 0,5 МПК КВМЭЗ в течение длительного периода (12 ч) (д).

Репрезентативные изображения с высоким разрешением были отобраны из двух независимых культур, результаты показывают анализ этих семи параметров, которые наблюдались по меньшей мере на 50 бактериальных клетках, собранных из двух независимых культур. Пороговый метод использовался для определения размера клеток (длина, ширина) *A.*

baumannii ATCC 19606. Планктонные бактериальные клетки в естественных условиях (без обработки) имеют гладкую поверхность с неповрежденными клеточными стенками и коккобациллами. Бактериальные клетки казались близкими друг к другу и отчетливо похожими на одном и том же изображении (рисунок 54а, в, г). Клеточные стенки и мембраны были неповрежденными без каких-либо разрывов или повреждений, отличались регулярным разделением перегородки, расположенной в центре клеток и разделяющей клетку на две симметричные части (рисунок 54в, г). Необработанные клетки были исследованы со средней длиной клеток $2,18 \pm 0,32$ мкм, шириной $1,15 \pm 0,19$ мкм и максимальной высотой $776,6 \pm 128,3$ нм для 50 клеток (таблица 27, рисунок 54б, рисунок 55А, Б, В), представляющих исследованный штамм *A. baumannii* ATCC 19606.

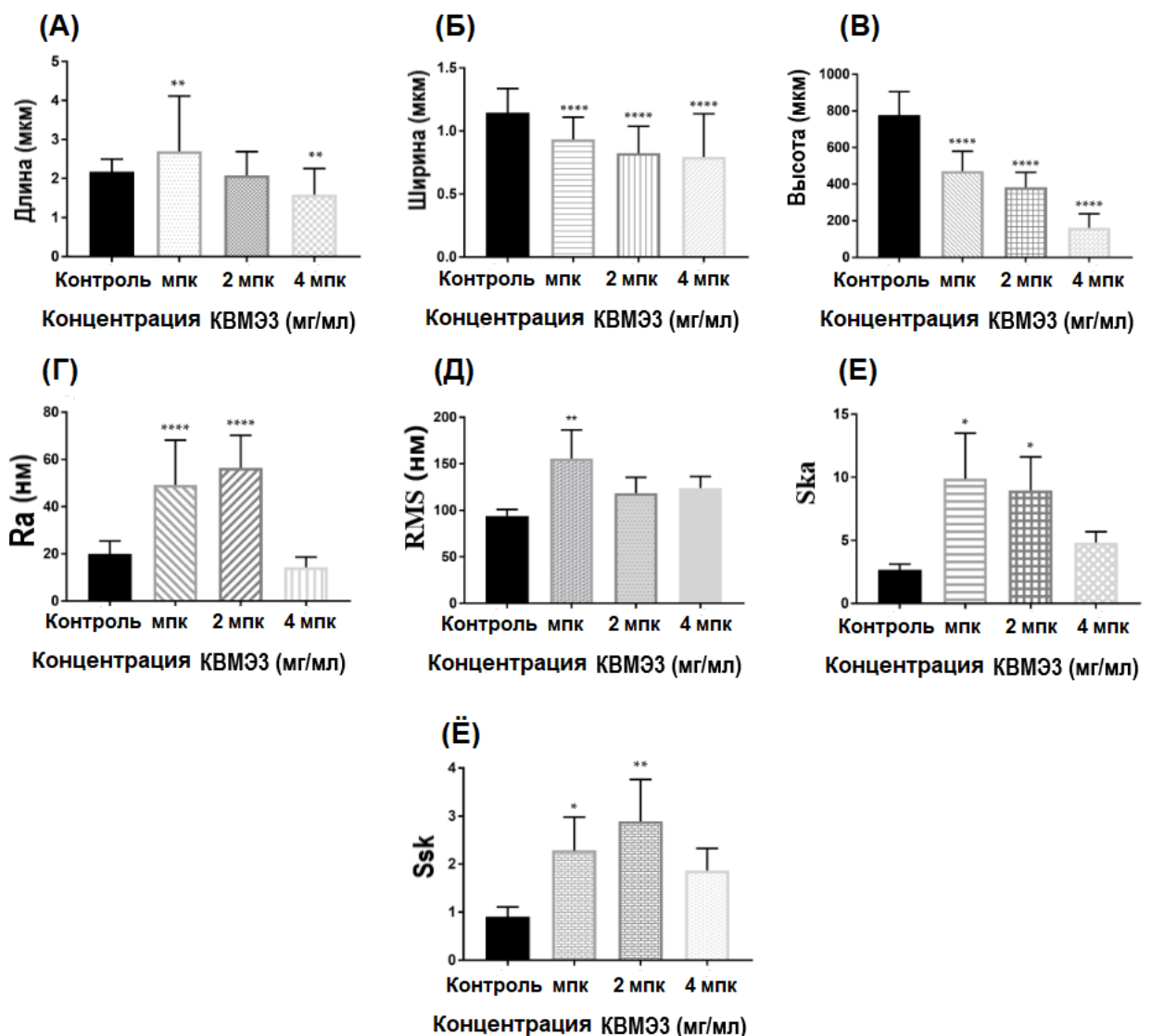


Рисунок 55. Размеры ячеек длина (А), ширина (Б), высота (В), шероховатость (Г), среднеквадратичное значение поверхности-RMS (Д), эксцесс-Ska (Е), асимметрия -Ssk (Ё) измерения по нескольким изображениям контрольных бактерий ($n = 50$) и 0,19 мг/мл (0,5 МПК), 0,38 мг/мл (МПК) и 0,75 мг/мл (2 МПК) КВМЭЗ, выделенного из бактерий, обработанных жиром

личинок НІ (n = 50). Все изображения АСМ, полученные в двух независимых экспериментах, для построения всех графиков использовалась Graph Pad Prism и односторонний тест множественных сравнений ANOVA Даннетта для статистического сравнения между обработанным и необработанным (контрольным) ячейки *A. baumannii* ATCC 19606, все данные представляют собой среднее \pm стандартное отклонение, значение p (* $p=0.041$ -**** $p < 0,0001$).

Было определено, что средняя волнистость поверхности (шероховатость-Ra) необработанной клетки *A. baumannii* ATCC 19606 составляет $19,9 \pm 5,6$ нм (таблица 27, рисунок 55Г). Среднеквадратичная (RMS) шероховатость, измеренная методом АСМ, коррелировала с шероховатостью среднеквадратичного значения для необработанного *A. baumannii* ATCC 19606, которая составляла $102,8 \pm 18,5$ нм. Параметры формы бактериальных клеток Ska и Ssk были рассчитаны и измерены с помощью 3D-анализа шероховатости изображений с использованием программы 3.5.0.19426 (NT-MDT Co, Амстердам, Нидерланды) и показали $4,12 \pm 2,9$ и $1,17 \pm 0,56$ соответственно (таблица 27, рисунок 55Д, Е, Ё).

7.13.7. Влияние низких концентраций КВМЭЗ на морфологию клеток *A. baumannii* ATCC 19606

2D, 3D и изображения Лапласа 5×5 (рисунок 54д, ё, ж) показывают нарушения и изменения в клетках *A. baumannii* ATCC 19606 после воздействия 0,5 МПК КВМЭЗ (0,19 мг/мл). Бактериальные клетки казались удлинёнными, длинными бациллами, без перегородки (рисунок 54д), 3D и лапласианские изображения 5×5 АСМ показывают, что клеточные стенки и мембрана были морщинистыми, грубыми, множественные расщепления и расщепления были очевидны во многих положениях клеточных стенок (черные и синие стрелки) (рисунок 54ё, ж). Лизированные и сплюснутые клетки были очевидны (зеленые стрелки и кружки), как показано на рисунке 54ё, ж. Размеры бактериальных клеток (длина, ширина), высота, шероховатость, среднеквадратичные значения и индексы формы (Ska, Ssk) определяли и измеряли после обработки 0,19 мг/мл КВМЭЗ против планктонных клеток *A. baumannii* ATCC 19606 (таблица 27, рисунок 55). Длина клеток *A. baumannii* ATCC 19606 была значительно увеличена ($p=0,0067$) на $2,7 \pm 1,4$ мкм по сравнению с необработанными бактериальными клетками, которые составили $2,18 \pm 0,32$ мкм (таблица 27, рисунок 55А), в то время как значительно уменьшилась ($p < 0,0001$) ширина клеток на $0,93 \pm 0,18$ мкм по сравнению с контрольной группой, которая была $1,15 \pm 0,19$ мкм (рисунок 55Б). Было очевидно резкое уменьшение высоты ($471,2 \pm 108,6$ нм) обработанных клеток *A. baumannii* ATCC 19606 с 0,5 МПК КВМЭЗ, и была очевидна значительная статистическая разница ($p < 0,0001$) по сравнению с необработанными клетками ($776,6 \pm 128,3$ нм) (таблица 27, рисунок 54б, е и рисунок 55В). Усадка на 40% высоты клеток штамма *A. baumannii* ATCC 19606, вызванная воздействием 0,5 МПК КВМЭЗ. Значения шероховатости бактериальной поверхности в зависимости от

обработки КВМЭЗ при 0,5 МПК были определены количественно для штамма *A. baumannii* ATCC 19606. Исследование изображений высоты, полученных АСМ в 2D и 3D, показало, что воздействие на клетки МЛЮ *A. baumannii* КВМЭЗ при 0,5 МПК, независимо от времени экспозиции (12 ч), значительно увеличило шероховатость поверхности ($p < 0,001$) клеток до $49,2 \pm 18,9$ нм, что в 2,47 раза больше, чем у их предшественников. соответствующий контроль ($19,9 \pm 5,6$ нм) (таблица 27, рисунок 55Г). Среднеквадратичная шероховатость поверхности клеток значительно увеличилась ($p < 0,0001$) и составила $143,08 \pm 35,6$ нм, когда *A. baumannii* ATCC 19606 подвергли воздействию 0,5 МПК КВМЭЗ по сравнению с контрольной группой ($102,8 \pm 18,5$ нм) (таблица 27 и рисунок 55Д). Средние значения Ska и Ssk у обработанных *A. baumannii* ATCC 19606 значительно увеличились ($p=0,012$, $p=0,016$) и составили ($8,37 \pm 4,2$, $2,29 \pm 0,69$) по сравнению с контрольными группами, в которых было зарегистрировано $4,12 \pm 2,9$ и $1,17 \pm 0,56$ соответственно (таблица 27, рисунок 55Е, Ё).

7.13.8. Влияние высоких концентраций КВМЭЗ на морфологию клеток *A. baumannii* ATCC 19606

Значительные изменения и нарушения были обнаружены в клетках *A. baumannii* ATCC 19606 после воздействия МПК (0,38 мг/мл) и 2 МПК (0,75 мг/мл) КВМЭЗ (рисунок 54з, й, к, л, н, о) в течение 20 и 10 минут, соответственно. Бактериальные клетки стали короче и грубее с неправильной перегородкой по сравнению с необработанными клетками. Воздействие МПК (0,38 мг/мл) КВМЭЗ в течение 20 минут вызвало несколько изменений в клеточных стенках и мембранах *A. baumannii* ATCC 19606, где клеточные стенки были разрушены, повреждены, на поверхности клеток образовались серьезные трещины, трещины, поры и серьезные отеки (синие стрелки, зеленый круг) (рисунок 54з, й). На рисунке 54к показана полная деградация и разрыв клеточных стенок, в то время как клеточная мембрана оказалась поврежденной и расщепленной во многих местах (черные стрелки) и разрушилась в нескольких клетках.

Длина клеток обработанного штамма *A. baumannii* ATCC 19606 уменьшилась ниже ($2,08 \pm 0,6$ мкм) без существенной ($p=0,91$) статистической разницы по сравнению с необработанными бактериями ($2,18 \pm 0,32$ мкм), в то время как ширина клеток была значительно ($p < 0,0001$) уменьшена до рекордных $0,82 \pm 0,21$ мкм, что соответствует их контрольным клеткам ($1,15 \pm 0,19$ мкм) (таблица 27, рисунок 55А, Б). Средний индекс высоты был резко снижен с большой статистической разницей ($p < 0,0001$) и составил $383 \pm 81,1$ нм по сравнению с необработанными клетками ($776,6 \pm 128,3$ нм), что привело к высокой усадке (51%) высоты клеток (таблица 27, рисунок 54й, рисунок 55В). Были рассчитаны и измерены параметры шероховатости (Ra, RMS) (таблица 27, рисунок 55Г, Д), где шероховатость поверхности значительно

увеличилась ($p < 0,0001$) и достигла $56,4 \pm 13,8$ нм, что в 2,8 раза больше, чем у необработанных бактерий ($19,9 \pm 5,6$ нм). Среднеквадратичный показатель *A. baumannii* ATCC 19606 ($109,8 \pm 16$ нм) не показал статистической разницы ($p = 0,32$), когда его обрабатывали МПК (0,38 мг/мл) КВМЭЗ, по сравнению с контрольными группами, в которых регистрировалось $102,8 \pm 18,5$ нм. Параметры формы (Ska, Ssk) *A. baumannii* ATCC 19606 были значительно увеличены ($p = 0,001$, $p = 0,02$) и составили $11,9 \pm 6,4$ и $2,9 \pm 0,87$ соответственно по сравнению с контрольной группой, в которой было зарегистрировано $4,12 \pm 2,9$ и $1,17 \pm 0,56$ соответственно.

Большие изменения и неправильные формы были сформированы, когда *A. baumannii* ATCC 19606 подвергался воздействию самой высокой концентрации 2 МПК (0,75 мг/мл) в течение короткого периода (10 мин), как показано на топографических 2D и 3D изображениях (рисунок 54л, н, о). Морфология клеток *A. baumannii* ATCC 19606 подвергалась серьезному влиянию, поскольку действия КВМЭЗ через 10 минут, когда большинство клеток теряло свои клеточные стенки, клеточные мембраны, а в некоторых случаях клетки были без перегородки, становились более набухающими, кровотоющими и распадались. На рисунке 54л показано, что вокруг разрушенных клеток образовалось большое количество клеточного мусора неправильной формы, где ожидаемой начальной реакцией должна была быть утечка большого количества жидкости из частично разрушенных клеток. Цитоплазматическая жидкость вытекла из внутренней мембраны клетки. Это может доказать, что КВМЭЗ вызвал повреждение внутренней мембраны бактерий.

При воздействии высокой концентрации КВМЭЗ 0,75 мг/мл большое количество цитоплазматической жидкости выделяется наружу из бактерий. Эти бактерии, по-видимому, либо сильно повреждены, либо их мембрана полностью разрушилась, и образовались прозрачные клетки с неясными и неправильными размерами (рисунок 54л, н, о). Это указывает на резкую проницаемость внутренней мембраны. Размеры бактериальных клеток были оценены длина, ширина, высота *A. baumannii* ATCC 19606, где было очевидно значительное снижение ($p = 0,0019$, $p < 0,0001$), которое составило $1,59 \pm 0,67$ мкм и $0,79 \pm 0,34$ мкм, соответственно, по сравнению с соответствующими контрольными группами ($2,18 \pm 0,32$ мкм, $1,15 \pm 0,19$ мкм) (таблица 27, рисунок 55А, Б). Высокая скорость уменьшения высоты ($162,4 \pm 75,4$ нм) клеток *A. baumannii* ATCC 19606, которые показали высокую достоверную разницу ($p < 0,0001$) по сравнению с необработанными клетками ($776,6 \pm 128,3$ нм) (таблица 27, рисунок 55В). Высокая скорость усадки по высоте ячейки (88%) *A. baumannii* ATCC 19606 был очевиден после воздействия 2 МПК КВМЭЗ в течение 10 минут. Индексы Ra и RMS для обработанного штамма *A. baumannii* ATCC 19606 не показали существенных различий ($p = 0,3$, $p = 0,19$) и составили $14,4 \pm 4,4$ нм, $104,1 \pm 40,2$ нм соответственно по сравнению с необработанными бактериями ($19,9 \pm 5,6$ нм, $126,4 \pm 22,6$ нм) (таблица 27, рисунок 55Г, Д). Ska и Ssk были охарактеризованы для формы клеток *A. baumannii* ATCC 19606, где оба параметра не показали статистической разницы

($p=0,55$, $p=0,13$), составив $6,7\pm 3,8$, $1,59\pm 0,66$ соответственно, по сравнению с контрольными группами (4.12 ± 2.9 , 1.17 ± 0.56), соответственно (таблица 27, рисунок 55E, Ё).

Таким образом, основываясь на нашем исследовании, механизм действия КВМЭЗ ЖК на грамотрицательные и грамположительные бактерии можно представить, как сложный зависящий от времени процесс, который можно разделить на три этапа. На начальной стадии КВМЭЗ повреждает наружную мембрану бактерий, которая в основном состоит из липополисахаридов (англ. LPS), вызывая образование мицелл LPS у грамотрицательных бактерий или пептидогликана у грамположительного штамма бактерий. Углубления, углубления, поры и углубления на клетках, а также обломки и небольшое количество жидкости, обнаруженные вокруг клеток, предполагают, что внешняя мембрана LPS или пептидогликановых структур стенки были затронуты действием ЖК, которые являются наиболее распространенными в КВМЭЗ. Кроме того, хвост ЖК вступает в реакцию с белком внешней поверхности, закрепленным на внешней мембране, в то время как головка ЖК расположена по кругу вокруг бактериальной клетки, образуя форму, подобную липосоме, которая препятствует поглощению клеткой питательных веществ и блокирует цепь переноса электронов. На втором этапе инициировали проницаемость и диссоциацию внутренней мембраны, где ЖК эффективны для уничтожения бактерий при низком pH ($pH\leq 5,5$). Следовательно, кислая группа в ЖК необходима для протонного эффекта, а отрицательная группа COO^- ионизируется при низком pH, что может высвободить протон H^+ , и это повлияет на клеточный осмос, что приведет к увеличению текучести клеточной мембраны и нарушению цепи переноса электронов. Падение pH внутри клетки влияет на выживание клеток посредством механического блокирования ферментов, где многочисленные ферментативные процессы зависят от pH [67]. Это может привести к расщеплению дыхательной цепи и нарушению процесса, связанного с мембраной, что приводит к дефектам деления клеточной стенки, наблюдаемым всеми методами микроскопии [92,98,131,133,391], что приводит к утечке цитоплазматического и генетического материала, которые были обнаружены и подтверждены при 260 нм и 280 нм [131]. Кроме того, повреждение мембраны приводило к большим потерям цитоплазматической жидкости. Будучи лишенными внутриклеточной жидкости и органелл, клеточная архитектурная поддержка была нарушена, и, следовательно, бактерии разрушились. На третьей стадии клеточные мембраны разрушались, оставляя после себя огромное количество остатков мембран или мусора. Только бактерии, подвергшиеся воздействию высоких концентраций КВМЭЗ, проявляли характеристики последней стадии [95].

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Основные результаты и выводы этого исследования можно сформулировать следующим образом:

1. Серия органических растворителей, используемых для растворения жира личинок *H. illucens*, где жир личинок полностью растворяется в неполярных растворителях (CCl_4 , C_6H_{14} , CH_2Cl_2 , CHCl_3 , DMFA, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$ CH_3CN , $\text{CHCl}_3 + \text{DMFA}$, $\text{C}_6\text{H}_{14} + \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, $\text{DMSO} + \text{CH}_3\text{CN}$, $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{CN}$, $\text{CHCl}_3 + \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH} + \text{DMCO}$), но гидрофобность повышается с увеличением соотношения воды (10-30%).
2. Впервые разработан экстрагирующий раствор для извлечения биоактивных соединений из липидной части личинок *H. illucens*, который состоял из воды: метанол: соляная кислота в соотношении (90: 9:1% об/об) (КВМ).
3. Разработан новый протокол для извлечения биоактивных соединений в дисперсионных системах на основе жира *H. illucens*, в котором биологически активные молекулы выделялись из масляного слоя, а полученные соединения диспергировались в эмульсионном растворе.
4. СЖК и их производные выделены из жира ЛМЧЛ после обработки раствором КВМ во время последовательной экстракции, СЖК были наиболее распространены в (КВМЭ1, КВМЭ2, КВМЭ3) с выходом 4,33%, где насыщенные жирные кислоты (НЖК) постепенно снижались до рекордных 59,2%, 51,09% и 51,32% соответственно, в то время как ненасыщенные жирные кислоты (неНЖК) увеличивались постепенно (26,05%, 27,42% и 29,64%), соответственно.
5. Процентное содержание цис-олеиновой кислоты (С18:1) и глицерина (С3:0) увеличивалось во время последовательной экстракции, чтобы быть (22.65%, 23.9%, 26.28%), (0%, 3.47%, 7.87%) против КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭ3 соответственно. Этот способ может быть применим в промышленности для повышения и обогащения процентного содержания очень важных биомолекул (олеиновой кислоты, глицерина), которые используются во многих фармацевтических и промышленных подходах
6. Третий экстракт КВМЭ3 был самым мощным среди других экстрактов (КВМЭ1, КВМЭ2).
7. КВМЭы могут ингибировать и уничтожать пять наиболее важных фитопатогенных бактерий (*Pantoea agglomerans* ATCC 27995, *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* ATCC 13951, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ATCC 15713, *Pectobacterium atrosepticum* ATCC ВАА-672D, *Dickeya solani* NCBI IPO 2222) с МПК (0,78 мг/мл), МПК50 (0,366 - 0,485 мг/мл) и МБК (0,78-1,56 мг/мл).

8. Экстракт КВМЭЗ ингибировал и уничтожал МЛЮ патогенные бактерии рыбы (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*), причем МПК составлял (0,095, 0,38 мг/мл), МПК50 (0,064 – 0,22 мг/мл) и МБК (0,19, 0,38 мг/мл) против *A. hydrophila* и *A. salmonicida*, соответственно.
9. Экстракт КВМЭЗ ингибировал и уничтожал МЛЮ патогенные бактерии человека (*K. pneumoniae* КРi1627, *K. pneumoniae* КРМ9, *S. aureus*, *A. baumannii* ATCC 19606) и ШЛЮ *K. pneumoniae* ATCC ВАА-273 с помощью МПК (0,19-0,25 мг/мл), МПК50 (0,147 – 0,22 мг/мл) и МБК (0,25-0,38 мг/мл).
10. Все патогенные бактерии МЛЮ или ШЛЮ человека не вызывали какой-либо резистентности к КВМЭЗ, в то время как обширная резистентность была индуцирована к антибиотику (пеницилин-стрептомицин-П/С, хлорамфеникол-Хл), кроме того, КВМЭЗ был безопасен для клеток ЕПЧ-293 человека с ПК50 266,1 мкг/мл, будучи бактериоцидным для всех бактериальных штаммов при тех же условиях.
11. Экстракт КВМЭЗ ингибировал и уничтожал прочную биопленку ($OP_{570} > 0,3$), образованную штаммами *K. pneumoniae*, через 24 ч при 0,5 мг/мл, кроме того, он уничтожал зрелую биопленку ($OP_{570} > 0,1,5$), образованную штаммами *K. pneumoniae*, через 72 ч при 1,0 мг/мл, по сравнению с эталонным антибиотиком (Док), который не мог ингибировать или уничтожать зрелую биопленку при 4 мг/мл. Суб-МПК (0,125 мг/мл) КВМЭЗ демонстрирует большой значимый эффект против факторов вирулентности штаммов hvKp, таких как слизистая вязкость, которая была снижена и устранена на 100%. Рудиментарная подвижность, особенно подергивающаяся подвижность штаммов hvKp, была значительно снижена на 50% по сравнению с контрольной группой. Механизм действия КВМЭЗ против биопленок hvKp подтверждается проницаемостью клеточных мембран, которая значительно увеличилась $>50\%$ и $>70\%$ после воздействия МПК (0,25 мг/мл) и 2 МПК (0,5 мг/мл) КВМЭЗ. Изменения в морфологии клеток, диспергированные биопленки, клеточный мусор и лизис клеток штаммов hvKp, вызванных КВМЭЗ, были визуализированы с помощью СЭМ. Кроме того, снижение выживаемости клеток и плотности зрелой биопленки ($>40\%$) исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии после обработки КВМЭЗ.
12. Время уничтожения КВМЭЗ против штаммов *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804 составило 5 и 10 мин после обработки 4 МПК, в то время как оно составило 12 ч и 24 ч соответственно, когда эти штаммы подвергались воздействию 4 МПК антибиотика (П/С).
13. Изучен механизм действия КВМЭЗ был изучен на грамположительных (*S. aureus* ATCC 55804) и грамотрицательных (*A. baumannii* ATCC 19606) бактериях. Это было выяснено с помощью нескольких этапов, включая: проницаемость клеточной мембраны, жесткость и осмотическую проницаемость, образование пор, утечку содержимого цитоплазмы, нарушение цепи переноса электронов и поглощения питательных веществ, затем деградацию клеточной

стенки с последующей гибелью клеток, все это подтверждено с помощью нескольких анализов (Аламар синий, бактериолиз (время уничтожения, кинетика кривой роста), внутриклеточный Аденозинтрифосфат, относительная проводимость, утечка цитоплазматического генетического содержимого при 260 и 280 нм соответственно и солеустойчивость. Изменения в морфологии клеток, клеточных компартаментах и размерах клеток визуализировали с помощью методов микроскопии (СЭМ, ПЭМ, АСМ).

Данные, полученные в работе, позволяют сделать следующие выводы:

Был обнаружен новый экстракционный раствор, состоящий из кислого водного метанола, для извлечения биоактивных молекул из жира личинок НІ; новая разработанная методика последовательной экстракции улучшила и увеличила количество выделенных СЖК и глицерина. Содержание цис-олиевой кислоты и глицерина значительно увеличились во время каскадной экстракции жира личинок НІ, таким образом, КВМЭЗ обладает наибольшей потенциальной активностью среди других экстрактов, кроме того, каскадная экстракция увеличила выход экстракта КВМЭы в течение трех циклов экстракции.

Активность КВМЭы оценивали в отношении фитопатогенных бактерий; биоцидная активность КВМЭы уничтожала пять наиболее важных фитопатогенных бактерий, включая *Pantoea agglomerans* ATCC 27995, *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* ATCC 13951, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ATCC 15713, *Pectobacterium atrosepticum* ATCC ВАА-672D, *Dickeya solani* NCBI IPO 2222 в зависимости от дозы.

Антимикробные свойства трех последовательных экстрактов КВМЭ1, КВМЭ2 и КВМЭЗ подтверждены в отношении патогенных бактерий рыб, вызывающих МЛУ. КВМЭЗ признан наиболее эффективным в отношении *A. hydrophila* и *A. slamonica*,

КВМЭЗ эффективно уничтожил гипермуковязкий клинический изолят МЛУ *K. pneumoniae* КРi1627, экологический изолят *K. pneumoniae* КРМ9 и стандартный для ШЛУ *srbarpeneme* резистан NDM1- *K. pneumoniae* ATCC ВАА-2473.

МЛУ патогенные бактерии человека не вырабатывали никакой устойчивости к КВМЭЗ при низких концентрациях в течение нескольких пассажей. Кроме того, КВМЭЗ был безопасен для ЭПЧ-293, в то время как он был смертельным для всех протестированных штаммов бактерий. КВМЭЗ уничтожал одиночные, смешанные и зрелые биопленки, образованные тремя штаммами *K. pneumoniae* в низких дозах.

Механизм антибактериального действия КВМЭЗ продемонстрировал, что КВМЭЗ вызывает бактериолиз *A. baumannii* ATCC 19606 и *S. aureus* ATCC 55804 после обработки в течение коротких периодов. Биологические анализы и методы микроскопии показали, что действия КВМЭЗ проходит несколькими механическими путями, при этом КВМЭЗ связывается с липополисахаридами (ЛПС) клеточной мембраны, увеличивая проницаемость, жесткость и

осмотическую проницаемость, что приводит к образованию пор, за которыми следует утечка содержимого цитоплазмы, нарушение цепи переноса электронов и поглощения питательных веществ, а затем клеточная стенка деградация с последующей гибелью клеток.

Список сокращений и условных обозначений

HI	<i>Hermetia illucens</i>
ЛМЧЛ	Личинки мухи Черная львинка
КВМ	Кислотная вода метанол
КВМЭ	Кислый водный метанольный экстракт
МЛУ	Множественная лекарственная устойчивость
ШЛУ	Широкой лекарственной устойчивостью
УПП	Устойчивость к пандемическим препаратам
ЖК	Жирные кислоты
СЖК	Свободные жирные кислоты
НЖК	Насыщенные жирные кислоты
неНЖК	Ненасыщенные жирные кислоты
ПНЖК	Полиненасыщенные жирные кислоты
СЭМ	Сканирующая электронная микроскопия
ПЭМ	Просвечивающая электронная микроскопия
АСМ	Атомно-силовая микроскопия
ЭПЧ-293 cells	Эмбриональная почка человека 293 клетки
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
МБК	Минимальная бактерицидная концентрация
МБИК	Минимальная ингибирующая биопленку концентрация
МКУБ	Минимальная концентрация уничтожения биопленки
МПК50, ПК50	50% от минимальной ингибирующей концентрации
ДЗИ	Диаметр зоны ингибирования
ЛБ	Лурия-Бертани агара
МХ	Мюллер-Хинтон агара

KPi1627	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kpi1627
KPM9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPM9
KP ATCC BAA-2473	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-2473
ГХ-МС	Газовая хроматография масс-спектрометрия
МТТ	(3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид)
ЭПК	Эйкозапентаеновая кислота
ДГК	Докозагексаеновая кислота
ТГ	Триацилглицерины
ГФЛ	Глицерофосфолипиды
PBPs	Penicillin-binding proteins
МЛГ	Монолаурат глицерина
FDA	Управление по контролю за продуктами и лекарствами
ЛК	Лауриновая кислота
АТФ	Аденозинтрифосфат
GTase	Glucosyltransferase
Hla	Альфа-гемолизин
ESBL	Бета-лактамазы расширенного спектра действия
<i>bla</i> gene	Бета-лактамный ген
<i>tet</i> gene	Ген тетрациклина
AheABC	<i>Aeromonas hydrophila</i> efflux ABC
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> sp
NDM-1	Нью-Дели Металло-β-лактамаза-1
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
hvKp	Hypervirulent <i>K. pneumoniae</i>

ATCC	American Type Culture Collection
ФБР	Фосфатный буферный физиологический раствор
КФ	Кристалльно-фиолетовый
PI	Йодид пропидия,
EtBr	бромид этидия
TCA	Триптоновый соевый агар
Pagg	<i>Pantoea agglomerans</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> subsp. <i>campestris</i>
Pbc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
Pba	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> ATCC BAA-672D
Dsol	<i>Dickeya solani</i> NCBI IPO 2222
ОЭ	Относительная электропроводность
ОП	Оптическая плотность
ОБ	Образование биопленки
Док	Доксициклин
П/С	Пенициллин-стрептомицин
NIST	National of institute standard and technology
DMCO	Диметилсульфоксид
ANOVA	Analysis of variance
SD	Стандартное отклонение
ECVs	Эпидемиологические Пороговые значения
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST	European Committee on AntiMPPKrobial Susceptibility Testing
ПЭ	последовательной экстракты
АС	Аламар синий

NA	Питательный агар
OK	Отрицательный контроль
Ra	Шероховатость средняя
Ska	Экссесс средний
Ssk	Асимметрия поверхности
RMS	среднеквадратичное значение поверхностей

Признание

Во-первых, вся благодарность и благословение Аллаху, который направляет, помогает и благословляет меня во всем и везде в моей жизни.

Моя глубочайшая благодарность и искренняя признательность моему научному руководителю доктору Елене Ивановне Марусич, кандидату медицинских наук, заместителю заведующего лабораторией разработки инновационных лекарственных средств и агробiotехнологий Школы биологической и медицинской физики Phystech, Кафедра инновационной фармацевтики, медицинского оборудования и биотехнологий, Университет МФТИ, Москва, Россия за ее руководство, жизненно важные указания, сотрудничество и поощрение во время этих исследований. Я выражаю свою благодарность доктору Сергею Викторовичу Леонову, доктору медицинских наук, заведующему лабораторией разработки инновационных лекарственных средств и агробiotехнологий кафедры инновационной фармацевтики, медицинского оборудования и биотехнологий МФТИ за его консультации и поддержку во время этого исследования. Вся благодарность доктору Денису Кузьмину, директору Школы биологической и медицинской физики Phystech МФТИ (Москва, Россия) за поддержку этого проекта.

Все благодаря доктору Константину Балакину, доктору химии. Sci, научному консультанту кафедры инновационной фармацевтики, медицинской техники и биотехнологий Университета МФТИ, Россия за его ценные комментарии, конструктивную критику в течение всего периода этой работы. Я хотел бы поблагодарить доктора Алексея Кокчина, аспиранта кафедры вычислительной физики конденсированных сред МФТИ, за помощь в проведении АСМ-анализа. Все благодаря доктору Андрею Дроздову, доктору философии, старшему научному сотруднику Лаборатории нанотехнологий, за его сотрудничество и помощь во время анализа SEM. Все благодаря доктору Елене Александровне Гущиной, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва, Россия, за помощь в проведении ТЭМ-анализа.

Я обязан огромной поддержкой, искренней любовью и глубочайшей благодарностью моей семье, матери, отцу, моим братьям и моей самой любимой жене, которые поддерживали меня в трудные времена и которые оказали мне всю возможную поддержку для завершения этого исследования, а также моим прекрасным детям Амру и Юсофу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aguilar-Marcelino, L.; Mendoza-de-Gives, P.; Al-Ani, L.K.T.; López-Arellano, M.E.; Gómez-Rodríguez, O.; Villar-Luna, E.; Reyes-Guerrero, D.E. Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. In *Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture*; Sharma, V., Salwan, R., Al-Ani, L.K.T., Eds.; Academic Press Inc.: London, United Kingdom, 2020; pp. 333–349 ISBN 9780128184691.
2. Erkinharju, T.; Dalmo, R.A.; Hansen, M.; Seternes, T. Cleaner fish in aquaculture: review on diseases and vaccination. *Rev. Aquac.* **2021**, *13*, 189–237, doi:10.1111/raq.12470.
3. Opiyo, M.A.; Marijani, E.; Muendo, P.; Odede, R.; Leschen, W.; Charo-Karisa, H. A review of aquaculture production and health management practices of farmed fish in Kenya. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **2018**, *6*, 141–148, doi:10.1016/J.IJVSM.2018.07.001.
4. Nimer, N.A. Nosocomial infection and antibiotic-resistant threat in the Middle East. **2022**, *15*, 631–639, doi:10.2147/IDR.S351755.
5. Lautenbach, E.; Abrutyn, E. Healthcare-acquired bacterial infections. In *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*; Philip S. Brachman, Abrutyn, E., Eds.; Springer, New York, NY, 2009; pp. 543–575 ISBN 9780387098425.
6. Algammal, A.M.; El-Sayed, M.E.; Youssef, F.M.; Saad, S.A.; Elhaig, M.M.; Batiha, G.E.; Hozzein, W.N.; Ghobashy, M.O.I. Prevalence, the antibiogram and the frequency of virulence genes of the most predominant bacterial pathogens incriminated in calf pneumonia. *AMB Express* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1186/s13568-020-01037-z.
7. Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
8. Jackman, J.A.; Yoon, B.K.; Li, D.; Cho, N.J. Nanotechnology formulations for antibacterial free fatty acids and monoglycerides. *Molecules* **2016**, *21*, 1–19, doi:10.3390/molecules21030305.
9. Thormar, H.; Hilmarsson, H. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *150*, 1–11, doi:10.1016/j.chemphyslip.2007.06.220.
10. Casillas-Vargas, G.; Ocasio-Malavé, C.; Medina, S.; Morales-Guzmán, C.; Del Valle, R.G.;

- Carballeira, N.M.; Sanabria-Ríos, D.J. Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Prog. Lipid Res.* **2021**, *82*, 1–10, doi:10.1016/j.plipres.2021.101093.
11. ITIS - Report: *Hermetia illucens* Available online: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=130298#null (accessed on Apr 7, 2022).
 12. Bonelli, M.; Bruno, D.; Brilli, M.; Gianfranceschi, N.; Tian, L.; Tettamanti, G.; Caccia, S.; Casartelli, M. Black soldier fly larvae adapt to different food substrates through morphological and functional responses of the midgut. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–27, doi:10.3390/ijms21144955.
 13. Bruno, D.; Bonelli, M.; De Filippis, F.; Di Lelio, I.; Tettamanti, G.; Casartelli, M.; Ercolini, D.; Caccia, S. The intestinal microbiota of *Hermetia illucens* larvae is affected by diet and shows a diverse composition in the different midgut regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, 1–14, doi:10.1128/AEM.01864-18.
 14. De Smet, J.; Wynants, E.; Cos, P.; Van Campenhout, L. Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and impact on exploitation potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, 1–17, doi:10.1128/AEM.02722-17.
 15. Bertinetti, C.; Samayoa, A.C.; Hwang, S.Y. Effects of feeding adults of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) on longevity, oviposition, and egg hatchability: Insights into optimizing egg production. *J. Insect Sci.* **2019**, *19*, 1–7, doi:10.1093/jisesa/iez001.
 16. Sheppard, D.C.; Tomberlin, J.K.; Joyce, J.A.; Kiser, B.C.; Sumner, S.M. Rearing methods for the black soldier fly (diptera: *Stratiomyidae*). *J. Med. Entomol.* **2002**, *39*, 695–698, doi:10.1603/0022-2585-39.4.695.
 17. Tomberlin, J.K.; Sheppard, D.C.; Joyce, J.A. Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: *Stratiomyidae*) reared on three artificial diets. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2002**, *95*, 379–386, doi:10.1603/0013-8746(2002)095[0379:SLHTOB]2.0.CO;2.
 18. Spranghers, T.; Ottoboni, M.; Klootwijk, C.; Owyn, A.; Deboosere, S.; De Meulenaer, B.; Michiels, J.; Eeckhout, M.; De Clercq, P.; De Smet, S. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2594–2600, doi:10.1002/jsfa.8081.
 19. Tomberlin, J.K.; Sheppard, D.C.; Joyce, J.A. Susceptibility of black soldier fly (Diptera:

- Stratiomyidae*) larvae and adults to four insecticides. *J. Econ. Entomol.* **2002**, *95*, 598–602, doi:10.1603/0022-0493-95.3.598.
20. Holmes, L.A.; VanLaerhoven, S.L.; Tomberlin, J.K. Lower temperature threshold of black soldier fly (Diptera: *Stratiomyidae*) development. *J. Insects as Food Feed* **2016**, *2*, 255–262, doi:10.3920/JIFF2016.0008.
 21. Nakamura, S.; Ichiki, R.T.; Shimoda, M.; Morioka, S. Small-scale rearing of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: *Stratiomyidae*), in the laboratory: low-cost and year-round rearing. *Appl. Entomol. Zool.* **2016**, *51*, 161–166, doi:10.1007/s13355-015-0376-1.
 22. Van Huis, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annu. Rev. Entomol.* **2013**, *58*, 563–583, doi:10.1146/annurev-ento-120811-153704.
 23. Lalander, C.; Diener, S.; Zurbrügg, C.; Vinnerås, B. Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). *J. Clean. Prod.* **2019**, *208*, 211–219, doi:10.1016/j.jclepro.2018.10.017.
 24. Meneguz, M.; Schiavone, A.; Gai, F.; Dama, A.; Lussiana, C.; Renna, M.; Gasco, L. Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 5776–5784, doi:10.1002/jsfa.9127.
 25. Barragan-Fonseca, K.B.; Dicke, M.; van Loon, J.J.A. Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed - a review. *J. Insects as Food Feed* **2017**, *3*, 105–120, doi:10.3920/JIFF2016.0055.
 26. Schiavone, A.; Dabbou, S.; De Marco, M.; Cullere, M.; Biasato, I.; Biasibetti, E.; Capucchio, M.T.; Bergagna, S.; Dezzutto, D.; Meneguz, M.; et al. Black soldier fly larva fat inclusion in finisher broiler chicken diet as an alternative fat source. *Animal* **2018**, *12*, 2032–2039, doi:10.1017/S1751731117003743.
 27. St-Hilaire, S.; Cranfill, K.; McGuire, M.A.; Mosley, E.E.; Tomberlin, J.K.; Newton, L.; Sealey, W.; Sheppard, C.; Irving, S. Fish offal recycling by the black soldier fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids. *J. World Aquac. Soc.* **2007**, *38*, 309–313, doi:10.1111/j.1749-7345.2007.00101.x.
 28. Bessa, L.W.; Pieterse, E.; Marais, J.; Hoffman, L.C. Why for feed and not for human consumption? The black soldier fly larvae. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 2747–2763, doi:10.1111/1541-4337.12609.

29. Barroso, F.G.; Sánchez-Muros, M.J.; Segura, M.; Morote, E.; Torres, A.; Ramos, R.; Guil, J.L. Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *62*, 8–13, doi:10.1016/j.jfca.2017.04.008.
30. Agoramoorthy, G.; Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V.; Hsu, M.J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian J. Microbiol.* **2007**, *38*, 739–742, doi:10.1590/S1517-83822007000400028.
31. Marusich, E.; Mohamed, H.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Fatty acids from *Hermetia illucens* larvae fat inhibit the proliferation and growth of actual phytopathogens. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1–21, doi:10.3390/microorganisms8091423.
32. Liland, N.S.; Biancarosa, I.; Araujo, P.; Biemans, D.; Bruckner, C.G.; Waagbø, R.; Torstensen, B.E.; Lock, E.-J.J. Modulation of nutrient composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–23, doi:10.1371/journal.pone.0183188.
33. Barroso, F.G.; Sánchez-Muros, M.J.; Segura, M.; Morote, E.; Torres, A.; Ramos, R.; Guil, J.L. Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *62*, 8–13, doi:10.1016/j.jfca.2017.04.008.
34. Ramos-Bueno, R.P.; González-Fernández, M.J.; Sánchez-Muros-Lozano, M.J.; García-Barroso, F.; Guil-Guerrero, J.L. Fatty acid profiles and cholesterol content of seven insect species assessed by several extraction systems. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 1471–1477, doi:10.1007/s00217-016-2647-7.
35. Sivakumar, R.; Jebanesan, A.; Govindarajan, M.; Rajasekar, P. Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2011**, *4*, 706–710, doi:10.1016/S1995-7645(11)60178-8.
36. Choi, W.H.; Jiang, M. Evaluation of antibacterial activity of hexanedioic acid isolated from *Hermetia illucens* larvae. *J. Appl. Biomed.* **2014**, *12*, 179–189, doi:10.1016/j.jab.2014.01.003.
37. Caligiani, A.; Marseglia, A.; Sorci, A.; Bonzanini, F.; Lolli, V.; Maistrello, L.; Sforza, S. Influence of the killing method of the black soldier fly on its lipid composition. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 276–282, doi:10.1016/j.foodres.2018.08.033.
38. Turker, H.; Yildirim, A.B.; Karakaş, F.P. Sensitivity of bacteria isolated from fish to some medicinal plants. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* **2009**, *9*, 181–186, doi:10.4194/trjfas.2009.0209.
39. Codjoe, F.; Donkor, E. Carbapenem Resistance: A Review. *Med. Sci.* **2018**, *6*, 1–28,

doi:10.3390/medsci6010001.

40. Sangduan, C. Skin care product containing *Hermetia illucens* extract. *Pat. Appl. Publ.* 2018, *1*, 1–4.
41. Ravi, H.K.; Vian, M.A.; Tao, Y.; Degrou, A.; Costil, J.; Trespeuch, C.; Chemat, F. Alternative solvents for lipid extraction and their effect on protein quality in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Clean. Prod.* **2019**, *238*, 1–13, doi:10.1016/j.jclepro.2019.117861.
42. Makkar, H.P.S.; Tran, G.; Heuzé, V.; Ankers, P. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2014**, *197*, 1–33, doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008.
43. Nordøy, A.; Marchioli, R.; Arnesen, H.; Videbæk, J. N-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Lipids* **2001**, *36*, 127–129, doi:10.1007/s11745-001-0695-7.
44. Gómez Candela, C.; Bermejo López, L.M.; Loria Kohen, V. Importancia del equilibrio del índice omega-6/omega-3 en el mantenimiento de un buen estado de salud. recomendaciones nutricionales. *Nutr. Hosp.* **2011**, *26*, 323–329, doi:10.3305/nh.2011.26.2.5117.
45. Ushakova, N.A.; Brodskii, E.S.; Kovalenko, A.A.; Bastrakov, A.I.; Kozlova, A.A.; Pavlov, D.S. Characteristics of lipid fractions of larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2016**, *468*, 209–212, doi:10.1134/S1607672916030145.
46. Zarantoniello, M.; Zimbelli, A.; Randazzo, B.; Compagni, M.D.; Truzzi, C.; Antonucci, M.; Riolo, P.; Loreto, N.; Osimani, A.; Milanović, V.; et al. Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) reared on roasted coffee by-product and *Schizochytrium* sp. as a sustainable terrestrial ingredient for aquafeeds production. *Aquaculture* **2020**, *518*, 1–15, doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734659.
47. Arrese, E.L.; Soulages, J.L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol.* **2010**, *55*, 207–225, doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356.
48. Visser, B.; Willett, D.S.; Harvey, J.A.; Alborn, H.T. Concurrence in the ability for lipid synthesis between life stages in insects. *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 1–8, doi:10.1098/rsos.160815.
49. Malcicka, M.; Visser, B.; Ellers, J. An evolutionary perspective on linoleic acid synthesis in animals. *Evol. Biol.* **2018**, *45*, 15–26, doi:10.1007/s11692-017-9436-5.
50. Hoc, B.; Genva, M.; Fauconnier, M.L.; Lognay, G.; Francis, F.; Caparros Megido, R. About lipid metabolism in *Hermetia illucens* (L. 1758): on the origin of fatty acids in prepupae. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1038/s41598-020-68784-8.
51. Ewald, N.; Vidakovic, A.; Langeland, M.; Kiessling, A.; Sampels, S.; Lalander, C. Fatty acid

- composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) – Possibilities and limitations for modification through diet. *Waste Manag.* **2020**, *102*, 40–47, doi:10.1016/j.wasman.2019.10.014.
52. Li, W.; Li, M.; Zheng, L.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Yu, Z.; Ma, Z.; Li, Q. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid accumulation in black soldier fly. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 4–9, doi:10.1186/s13068-015-0306-z.
 53. Liu, X.; Chen, X.; Wang, H.; Yang, Q.; Ur Rehman, K.; Li, W.; Cai, M.; Li, Q.; Mazza, L.; Zhang, J.; et al. Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–21, doi:10.1371/journal.pone.0182601.
 54. Lange, K.W.; Nakamura, Y. Edible insects as future food: chances and challenges. *J. Futur. Foods* **2021**, *1*, 38–46, doi:10.1016/j.jfutfo.2021.10.001.
 55. van Huis, A.; Oonincx, D.G.A.B. The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2017**, *37*, 1–14, doi:10.1007/s13593-017-0452-8.
 56. Tvrzicka, E.; Kremmyda, L.S.; Stankova, B.; Zak, A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review, part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 117–130, doi:10.5507/bp.2011.038.
 57. Lee, A.G. Lipid-protein interactions in biological membranes: A structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2003**, *1612*, 1–40, doi:10.1016/S0005-2736(03)00056-7.
 58. Anthony, R.; Stuart, B. Solvent extraction and characterization of neutral lipids in *Oocystis* sp. *Front. Energy Res.* **2015**, *3*, 1–5, doi:10.3389/fenrg.2014.00064.
 59. Müller, A.; Wolf, D.; Gutzeit, H.O. The black soldier fly, *Hermetia illucens* - a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2017**, *72*, 351–363, doi:10.1515/znc-2017-0030.
 60. Stan, D.; Enciu, A.M.; Mateescu, A.L.; Ion, A.C.; Brezeanu, A.C.; Stan, D.; Tanase, C. Natural compounds with antimicrobial and antiviral effect and nanocarriers used for their transportation. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 1–25, doi:10.3389/fphar.2021.723233.
 61. Saini, R.K.; Prasad, P.; Shang, X.; Keum, Y.S. Advances in lipid extraction methods—a review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–19, doi:10.3390/ijms222413643.
 62. Kumar, R.R.; Rao, P.H.; Arumugam, M. Lipid extraction methods from microalgae: A comprehensive review. *Front. Energy Res.* **2015**, *2*, 1–9, doi:10.3389/fenrg.2014.00061.
 63. Ravi, H.K.; Degrou, A.; Costil, J.; Trespeuch, C.; Chemat, F.; Vian, M.A. Larvae mediated

- valorization of industrial, agriculture and food wastes: Biorefinery concept through bioconversion, processes, procedures, and products. *Processes* **2020**, *8*, 1–40, doi:10.3390/PR8070857.
64. Laroche, M.; Perreault, V.; Marciniak, A.; Gravel, A.; Chamberland, J.; Doyen, A. Comparison of conventional and sustainable lipid extraction methods for the production of oil and protein isolate from edible insect meal. *Foods* **2019**, *8*, 1–11, doi:10.3390/foods8110572.
65. Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger principles of biochemistry*; 4 th.; New York : W.H. Freeman, 2017, P:1-1120; ISBN 9781319108243.
66. Franco, A.; Scieuzo, C.; Salvia, R.; Petrone, A.M.; Tafi, E.; Moretta, A.; Schmitt, E.; Falabella, P. Lipids from *Hermetia illucens*, an innovative and sustainable source. *Sustain.* **2021**, *13*, 1–23, doi:10.3390/su131810198.
67. Scrimgeour, C. Chemistry of fatty acids. In *Bailey's industrial oil and fat products*; Shamsi, I.H., Shamsi, B.H., Jiang, L., Eds.; John Wiley and Sons, Inc: New York, USA, 2005; Vol. 1, p. 44.
68. Hill, K. Fats and Oils as Oleochemical Raw Materials. *J. Oleo Sci.* **2001**, *50*, 433–444, doi:10.5650/jos.50.433.
69. Kowalska, D.; Gruczynska, E.; Kowalska, M. The effect of enzymatic interesterification on the physico-chemical properties and thermo-oxidative stabilities of beef tallow stearin and rapeseed oil blends. *J. Therm. Anal. Calorim. 2014 1201* **2014**, *120*, 507–517, doi:10.1007/S10973-014-3869-1.
70. Kowalska, M.; Woźniak, M.; Żbikowska, A.; Kozłowska, M. Physicochemical characterization and evaluation of emulsions containing chemically modified fats and different hydrocolloids. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1–17, doi:10.3390/biom10010115.
71. Kundu, P.; Agrawal, A.; Mateen, H.; Mishra, I.M. Stability of oil-in-water macro-emulsion with anionic surfactant: Effect of electrolytes and temperature. *Chem. Eng. Sci.* **2013**, *102*, 176–185, doi:10.1016/J.CES.2013.07.050.
72. Mohamed, H.; Marusich, E.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Fatty acids - enriched fractions of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) larvae fat can combat MDR pathogenic fish bacteria *Aeromonas* spp. *Int. J. Mol. Sci* **2021**, *22*, 1–27, doi:10.3390/ijms22168829.
73. Pati, S.; Nie, B.; Arnold, R.D.; Cummings, B.S. Extraction, chromatographic and mass spectrometric methods for lipid analysis. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30*, 695–709, doi:10.1002/BMC.3683.

74. Chiu, H.H.; Kuo, C.H. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *J. Food Drug Anal.* **2020**, *28*, 60–73, doi:10.1016/j.jfda.2019.10.003.
75. Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 281–296, doi:10.1038/nrm.2017.138.
76. Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J.; Collins, J.J. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 423–435, doi:10.1038/nrmicro2333.
77. Gajdács, M.; Albericio, F. Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics* **2019**, *8*, 8–11, doi:10.3390/antibiotics8030129.
78. Iskandar, K.; Murugaiyan, J.; Halat, D.H.; Hage, S. El; Chibabhai, V.; Adukkadukkam, S.; Roques, C.; Molinier, L.; Salameh, P.; Van Dongen, M. Antibiotic discovery and resistance: The chase and the race. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–38, doi:10.3390/antibiotics11020182.
79. Dodds, D.R. Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *134*, 139–146, doi:10.1016/j.bcp.2016.12.005.
80. Fortman, J.L.; Mukhopadhyay, A. The future of antibiotics: emerging technologies and stewardship. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 515–517, doi:10.1016/j.tim.2016.04.003.
81. Zaman, S. Bin; Hussain, M.A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K.T.; Hossain, N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus* **2017**, *9*, 1–9, doi:10.7759/cureus.1403.
82. Economou, V.; Gousia, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* **2015**, *8*, 49–61, doi:10.2147/IDR.S55778.
83. MacGowan, A.; Macnaughton, E. Antibiotic resistance. *Med. (United Kingdom)* **2017**, *45*, 622–628, doi:10.1016/j.mpmed.2017.07.006.
84. Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 464–472, doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015.
85. Uddin, T.M.; Chakraborty, A.J.; Khusro, A.; Zidan, B.R.M.; Mitra, S.; Emran, T. Bin; Dhama, K.; Ripon, M.K.H.; Gajdács, M.; Sahibzada, M.U.K.; et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J. Infect. Public Health* **2021**, *14*, 1750–1766, doi:10.1016/j.jiph.2021.10.020.
86. C Reygaert, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 482–501, doi:10.3934/microbiol.2018.3.482.

87. Blair, J.M.A.; Webber, M.A.; Baylay, A.J.; Ogbolu, D.O.; Piddock, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 42–51, doi:10.1038/nrmicro3380.
88. Grossman, T.H. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, 1–24, doi:10.1101/cshperspect.a025387.
89. Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **2017**, *33*, 300–305, doi:10.4103/JOACP.JOACP_349_15.
90. Bush, K.; Bradford, P.A. β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. **2016**, *6*, 1–22, doi:10.1101/cshperspect.a025247.
91. Foster, T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 430–449, doi:10.1093/femsre/fux007.
92. Shin, S.Y.; Bajpai, V.K.; Kim, H.R.; Kang, S.C. Antibacterial activity of eicosapentaenoic acid (EPA) against foodborne and food spoilage microorganisms. *LWT - Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 1515–1519, doi:10.1016/j.lwt.2006.12.005.
93. Hall, C.W.; Mah, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 276–301, doi:10.1093/femsre/fux010.
94. Fischer, C.L.; Drake, D.R.; Dawson, D. V.; Blanchette, D.R.; Brogden, K.A.; Wertz, P.W. Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1157–1161, doi:10.1128/AAC.05151-11.
95. Yoon, B.K.; Jackman, J.A.; Valle-González, E.R.; Cho, N.J. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1–40, doi:10.3390/ijms19041114.
96. Desbois, A.P.; Smith, V.J. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1629–1642, doi:10.1007/s00253-009-2355-3.
97. Hobby, C.R.; Herndon, J.L.; Morrow, C.A.; Peters, R.E.; Symes, S.J.K.; Giles, D.K. Exogenous fatty acids alter phospholipid composition, membrane permeability, capacity for biofilm formation, and antimicrobial peptide susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiologyopen* **2019**, *8*, 1–11, doi:10.1002/mbo3.635.
98. Hyldgaard, M.; Sutherland, D.S.; Sundh, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Antimicrobial mechanism

- of monocaprylate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2957–2965, doi:10.1128/AEM.07224-11.
99. Nakatsuji, T.; Kao, M.C.; Fang, J.Y.; Zouboulis, C.C.; Zhang, L.; Gallo, R.L.; Huang, C.M. Antimicrobial property of lauric acid against propionibacterium acnes: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *129*, 2480–2488, doi:10.1038/jid.2009.93.
100. Schlievert, P.M.; Kilgore, S.H. Glycerol monolaurate contributes to the antimicrobial and anti-inflammatory activity of human milk. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–9, doi:10.1038/s41598-019-51130-y.
101. Matsue, M.; Mori, Y.; Nagase, S.; Sugiyama, Y.; Hirano, R.; Ogai, K.; Ogura, K.; Kurihara, S.; Okamoto, S. Measuring the antimicrobial activity of lauric acid against various bacteria in human gut microbiota using a new method. *Cell Transplant.* **2019**, *28*, 1528–1541, doi:10.1177/0963689719881366.
102. Nair, M.K.M.; Joy, J.; Vasudevan, P.; Hinckley, L.; Hoagland, T.A.; Venkitanarayanan, K.S. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 3488–3495, doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2.
103. Thamphiwatana, S.; Gao, W.; Obonyo, M.; Zhang, L. In vivo treatment of *Helicobacter pylori* infection with liposomal linolenic acid reduces colonization and ameliorates inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 17600–17605, doi:10.1073/pnas.1418230111.
104. Heerklotz, H. Interactions of surfactants with lipid membranes. *Q. Rev. Biophys.* **2008**, *41*, 205–264, doi:10.1017/S0033583508004721.
105. Skřivanová, E.; Marounek, M.; Dlouhá, G.; Kaňka, J. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2-C18 fatty acids. *Lett. Appl. Microbiol.* **2005**, *41*, 77–81, doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01709.x.
106. Bazinet, R.P.; Layé, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 771–785, doi:10.1038/nrn3820.
107. Thormar, H.; Hilmarsen, H.; Bergsson, G. Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 522–526, doi:10.1128/AEM.72.1.522-526.2006.
108. Sun, C.Q.; O'Connor, C.J.; Robertson, A.M. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2003**, *36*, 9–17, doi:10.1016/S0928-8244(03)00008-7.

109. Chen, X.; Zhao, X.; Deng, Y.; Bu, X.; Ye, H.; Guo, N. Antimicrobial potential of myristic acid against *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2019**, *72*, 298–305, doi:10.1038/s41429-019-0152-5.
110. Schlievert, P.M.; Peterson, M.L. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0040350.
111. Morikawa, T.; Yamamoto, Y.; Nonomura, Y. Effect of pH on bactericidal activities of calcium laurate. *J. Oleo Sci.* **2018**, *67*, 859–862, doi:10.5650/jos.ess17280.
112. Lee, S.E.; Lim, J.W.; Kim, J.M.; Kim, H. Anti-inflammatory mechanism of polyunsaturated fatty acids in *Helicobacter pylori* -infected gastric epithelial cells. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 1–12, doi:10.1155/2014/128919.
113. Jung, S.W.; Lee, S.W. The antibacterial effect of fatty acids on *Helicobacter pylori* infection. *Korean J. Intern. Med.* **2016**, *31*, 30–35, doi:10.3904/kjim.2016.31.1.30.
114. Correia, M.; Michel, V.; Matos, A.A.; Carvalho, P.; Oliveira, M.J.; Ferreira, R.M.; Dillies, M.A.; Huerre, M.; Seruca, R.; Figueiredo, C.; et al. Docosahexaenoic acid inhibits *Helicobacter pylori* growth in vitro and mice gastric mucosa colonization. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–9, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0035072.
115. Bergsson, G.; Arnfinnsson, J.; Steingrímsson, Ó.; Thormar, H. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *Apms* **2001**, *109*, 670–678, doi:10.1034/j.1600-0463.2001.d01-131.x.
116. Marounek, M.; Skřivanová, E.; Rada, V. Susceptibility of *Escherichia coli* to C2-C18 Fatty Acids. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2003**, *48*, 731–735, doi:10.1007/BF02931506.
117. Skřivanová, E.; Savka, O.G.; Marounek, M. In vitro effect of C2-C18 fatty acids on Salmonellas. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2004**, *49*, 199–202, doi:10.1007/BF02931402.
118. Kollanoor, A.; Vasudevan, P.; Nair, M.K.M.; Hoagland, T.; Venkitanarayanan, K. Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monocaprylin and sodium caprylate). *Aquac. Res.* **2007**, *38*, 1293–1300, doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01799.x.
119. Kim, S.A.; Rhee, M.S. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 6552–6560, doi:10.1128/AEM.02164-13.
120. Kim, S.A.; Rhee, M.S. Synergistic antimicrobial activity of caprylic acid in combination with

- citric acid against both *Escherichia coli* O157: H7 and indigenous microflora in carrot juice. *Food Microbiol.* **2015**, *49*, 166–172, doi:10.1016/j.fm.2015.02.009.
121. Kitahara, T.; Koyama, N.; Matsuda, J.; Aoyama, Y.; Hirakata, Y.; Kamihira, S.; Kohno, S.; Nakashima, M.; Sasaki, H. Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1321–1326, doi:10.1248/bpb.27.1321.
 122. Lin, M.H.; Hsu, T.L.; Lin, S.Y.; Pan, Y.J.; Jan, J.T.; Wang, J.T.; Khoo, K.H.; Wu, S.H. Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2613–2623, doi:10.1074/mcp.M900276-MCP200.
 123. Preuss, H.G.; Echard, B.; Dadgar, A.; Talpur, N.; Manohar, V.; Enig, M.; Bagchi, D.; Ingram, C. Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: In vitro and in vivo studies. *Toxicol. Mech. Methods* **2005**, *15*, 279–285, doi:10.1080/15376520590968833.
 124. Choi, M.J.; Kim, S.A.; Lee, N.Y.; Rhee, M.S. New decontamination method based on caprylic acid in combination with citric acid or vanillin for eliminating *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *166*, 499–507, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.016.
 125. Kim, S.A.; Rhee, M.S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157: H7. *Food Control* **2016**, *60*, 447–454, doi:10.1016/j.foodcont.2015.08.022.
 126. Hovorková, P.; Laloučková, K.; Skřivanová, E. Determination of in vitro antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. *Czech J. Anim. Sci.* **2018**, *63*, 119–125, doi:10.17221/70/2017-CJAS.
 127. Anacarso, I.; Quartieri, A.; De Leo, R.; Pulvirenti, A. Evaluation of the antimicrobial activity of a blend of monoglycerides against *Escherichia coli* and *Enterococci* with multiple drug resistance. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 85–89, doi:10.1007/s00203-017-1419-5.
 128. Fung, K.P.; Han, Q.B.; Ip, M.; Yang, X.S.; Lau, C.B.; Chan, B.C. Synergists from *Portulaca oleracea* with macrolides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and related mechanism. *Hong Kong Med. J. = Xianggang yi xue za zhi* **2017**, *23*, 38–42.
 129. Won, S.R.; Hong, M.J.; Kim, Y.M.; Li, C.Y.; Kim, J.W.; Rhee, H.I. Oleic acid: An efficient

- inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 4999–5002, doi:10.1016/j.febslet.2007.09.045.
130. Zhou, X.; Stevens, M.J.A.; Neuenschwander, S.; Schwarm, A.; Kreuzer, M.; Bratus-Neuenschwander, A.; Zeitz, J.O. The transcriptome response of the ruminal methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* strain M1 to the inhibitor lauric acid. *BMC Res. Notes* **2018**, *11*, 1–10, doi:10.1186/S13104-018-3242-8/TABLES/2.
131. Cartron, M.L.; England, S.R.; Chiriac, A.I.; Josten, M.; Turner, R.; Rauter, Y.; Hurd, A.; Sahl, H.G.; Jones, S.; Foster, S.J. Bactericidal activity of the human skin fatty acid cis-6-hexadecanoic acid on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3599–3609, doi:10.1128/AAC.01043-13.
132. Herndon, J.L.; Peters, R.E.; Hofer, R.N.; Simmons, T.B.; Symes, S.J.; Giles, D.K. Exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) promote changes in growth, phospholipid composition, membrane permeability and virulence phenotypes in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 1–12, doi:10.1186/s12866-020-01988-0.
133. Wang, J.; Ma, M.; Yang, J.; Chen, L.; Yu, P.; Wang, J.; Gong, D.; Deng, S.; Wen, X.; Zeng, Z. In vitro antibacterial activity and mechanism of monocaprylin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 1988–1996, doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-248.
134. Peters, J.S.; Chin, C.K. Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*, 117–124, doi:10.1016/S0981-9428(02)00014-1.
135. Zheng, C.J.; Yoo, J.S.; Lee, T.G.; Cho, H.Y.; Kim, Y.H.; Kim, W.G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5157–5162, doi:10.1016/j.febslet.2005.08.028.
136. Sado-Kamdem, S.L.; Vannini, L.; Guerzoni, M.E. Effect of alpha-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *129*, 288–294, doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.12.010.
137. Schönfeld, P.; Wojtczak, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 231–241, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.04.029.
138. Adolph, S.; Bach, S.; Blondel, M.; Cueff, A.; Moreau, M.; Pohnert, G.; Poulet, S.A.; Wichard, T.; Zuccaro, A. Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different

- phyla. *J. Exp. Biol.* **2004**, *207*, 2935–2946, doi:10.1242/jeb.01105.
139. Yaman, S.O.; Ayhanci, A. Lipid Peroxidation. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2021**, *47*, 759–764, doi:10.5772/INTECHOPEN.95802.
140. Ochońska, D.; Ścibik, Ł.; Brzywczy-Włoch, M. Biofilm formation of clinical *klebsiella pneumoniae* strains isolated from tracheostomy tubes and their association with antimicrobial resistance, virulence and genetic diversity. *Pathogens* **2021**, *10*, 1–15, doi:10.3390/pathogens10101345.
141. Flemming, H.C.; Wuerz, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 247–260, doi:10.1038/s41579-019-0158-9.
142. Bjarnsholt, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Suppl.* **2013**, *121*, 1–51, doi:10.1111/apm.12099.
143. Estrela, A.B.; Abraham, W.R. Combining biofilm-controlling compounds and antibiotics as a promising new way to control biofilm infections. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 1374–1393, doi:10.3390/ph3051374.
144. Baker, L.Y.; Hobby, C.R.; Siv, A.W.; Bible, W.C.; Glennon, M.S.; Anderson, D.M.; Symes, S.J.; Giles, D.K. *Pseudomonas aeruginosa* responds to exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by modifying phospholipid composition, membrane permeability, and phenotypes associated with virulence. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 1–12, doi:10.1186/s12866-018-1259-8.
145. Kumar, P.; Lee, J.H.; Beyenal, H.; Lee, J. Fatty acids as antibiofilm and antivirulence agents. *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 753–768, doi:10.1016/j.tim.2020.03.014.
146. Macabuhay, A.; Arsova, B.; Walker, R.; Johnson, A.; Watt, M.; Roessner, U. Modulators or facilitators? Roles of lipids in plant root–microbe interactions. *Trends Plant Sci.* **2022**, *27*, 180–190, doi:10.1016/J.TPLANTS.2021.08.004.
147. Park, T.; Im, J.; Kim, A.R.; Lee, D.; Jeong, S.; Yun, C.H.; Han, S.H. Short-chain fatty acids inhibit the biofilm formation of *Streptococcus gordonii* through negative regulation of competence-stimulating peptide signaling pathway. *J. Microbiol.* **2021**, *59*, 1142–1149, doi:10.1007/s12275-021-1576-8.
148. Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Park, S.; Kim, S.; Lee, J. Inhibition of polymicrobial biofilm formation by saw palmetto oil, lauric acid and myristic acid. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15*, 590–602, doi:10.1111/1751-7915.13864.

149. Lee, J.H.; Kim, Y.G.; Park, J.G.; Lee, J. Supercritical fluid extracts of *Moringa oleifera* and their unsaturated fatty acid components inhibit biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Food Control* **2017**, *80*, 74–82, doi:10.1016/j.foodcont.2017.04.035.
150. Yuyama, K.T.; Rohde, M.; Molinari, G.; Stadler, M.; Abraham, W.R. Unsaturated fatty acids control biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1–11, doi:10.3390/antibiotics9110788.
151. Zhou, Y.; Guo, Y.; Sun, X.; Ding, R.; Wang, Y.; Niu, X.; Wang, J.; Deng, X. Application of oleanolic acid and its analogues in combating pathogenic bacteria in vitro/ vivo by a two-pronged strategy of β -lactamases and hemolysins. *ACS Omega* **2020**, *5*, 11424–11438, doi:10.1021/acsomega.0c00460.
152. Kim, Y.G.; Lee, J.H.; Raorane, C.J.; Oh, S.T.; Park, J.G.; Lee, J. Herring oil and omega fatty acids inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–10, doi:10.3389/FMICB.2018.01241/FULL.
153. Liaw, S.J.; Lai, H.C.; Wang, W.B. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 6836–6845, doi:10.1128/IAI.72.12.6836-6845.2004.
154. Kannan, V.; Bastas, K.; Devi, R. Scientific and economic impact of plant pathogenic bacteria. In *sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria*; Kannan, V., Bastas, K., Devi, R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA, 2015, pp. 369-392.
155. Strange, R.N.; Scott, P.R. Plant disease: A threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43*, 83–116, doi:10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839.
156. Czajkowski, R.; Pérombelon, M.C.M.; Jafra, S.; Lojkowska, E.; Potrykus, M.; Van Der Wolf, J.M.; Sledz, W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: A review. *Ann. Appl. Biol.* **2015**, *166*, 18–38, doi:10.1111/aab.12166.
157. Pritchard, L.; Glover, R.H.; Humphris, S.; Elphinstone, J.G.; Toth, I.K. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 12–24, doi:10.1039/c5ay02550h.
158. Anajjar, B.; Aitmhand, R.; Timinouni, M.; Ennaji, M.M. Characterization by PCR of two strains of *Erwinia carotovora* isolated from the potato rhizosphere in the region of greater Casablanca in Morocco. *EPPO Bull.* **2007**, *37*, 175–180, doi:10.1111/j.1365-2338.2007.01057.x.

159. Cui, Y.; Chatterjee, A.; Yang, H.; Chatterjee, A.K. Regulatory network controlling extracellular proteins in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: FlhDC, the master regulator of flagellar genes, activates *rsmB* regulatory RNA production by affecting *gacA* and *hexA* (*IrhA*) expression. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 4610–4623, doi:10.1128/JB.01828-07.
160. Schwartz, A.R.; Potnis, N.; Timilsina, S.; Wilson, M.; Patané, J.; Martins, J.; Minsavage, G. V.; Dahlbeck, D.; Akhunova, A.; Almeida, N.; et al. Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–17, doi:10.3389/fmicb.2015.00535.
161. Wulff, E.G.; Mguni, C.M.; Mortensen, C.N.; Keswani, C.L.; Hockenhull, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 317–325, doi:10.1023/A:1015671031906.
162. Motyka, A.; Zoledowska, S.; Sledz, W.; Lojkowska, E. Molecular methods as tools to control plant diseases caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* spp: A minireview. *N. Biotechnol.* **2017**, *39*, 181–189, doi:10.1016/j.nbt.2017.08.010.
163. Martins, P.M.M.; Merfa, M. V.; Takita, M.A.; De Souza, A.A. Persistence in phytopathogenic bacteria: Do we know enough? *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–14, doi:10.3389/fmicb.2018.01099.
164. Barron, J.C.; Forsythe, S.J. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 2111–2117, doi:10.4315/0362-028X-70.9.2111.
165. Gunasekera, T.S.; Paul, N.D. Ecological impact of solar ultraviolet-B (UV-B: 320-290 nm) radiation on *Corynebacterium aquaticum* and *Xanthomonas* sp. colonization on tea phyllosphere in relation to blister blight disease incidence in the field. *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *44*, 513–519, doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02102.x.
166. Leonard, S.; Hommais, F.; Nasser, W.; Reverchon, S. Plant–phytopathogen interactions: bacterial responses to environmental and plant stimuli. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 1689–1716, doi:10.1111/1462-2920.13611.
167. Aćimović, S.G.; Zeng, Q.; McGhee, G.C.; Sundin, G.W.; Wise, J.C. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 1–10, doi:10.3389/fpls.2015.00016.

168. Hippler, F.W.R.; Boaretto, R.M.; DAVIS, V.L.; Quaggio, J.A.; Azevedo, R.A.; Mattos-Jr, D. Oxidative stress induced by Cu nutritional disorders in Citrus depends on nitrogen and calcium availability. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-19735-x.
169. McGhee, G.C.; Sundin, G.W. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **2011**, *101*, 192–204, doi:10.1094/PHYTO-04-10-0128.
170. Del Campo, R.; Russi, P.; Mara, P.; Mara, H.; Peyrou, M.; De León, I.P.; Gaggero, C. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *298*, 143–148, doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01709.x.
171. Gochez, A.M.; Huguet-Tapia, J.C.; Minsavage, G. V.; Shantaraj, D.; Jalan, N.; Strauß, A.; Lahaye, T.; Wang, N.; Canteros, B.I.; Jones, J.B.; et al. Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. *BMC Genomics* **2018**, *19*, 1–14, doi:10.1186/s12864-017-4408-9.
172. Richard, D.; Ravigné, V.; Rieux, A.; Facon, B.; Boyer, C.; Boyer, K.; Grygiel, P.; Javegny, S.; Terville, M.; Canteros, B.I.; et al. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. *Mol. Ecol.* **2017**, *26*, 2131–2149, doi:10.1111/mec.14007.
173. Ons, L.; Bylemans, D.; Thevissen, K.; Cammue, B.P.A. Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1–19, doi:10.3390/microorganisms8121930.
174. Lebecka, R.; Zimnoch-Guzowska, E.; Kaczmarek, Z. Resistance to soft rot (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) in tetraploid potato families obtained from 4x-2x crosses. *Am. J. Potato Res.* **2005**, *82*, 203–210, doi:10.1007/BF02853586.
175. Jamiołkowska, A. Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy* **2020**, *10*, 1–11, doi:10.3390/agronomy10020173.
176. Bartolotta, S.; García, C.C.; Candurra, N.A.; Damonte, E.B. Effect of fatty acids on arenavirus replication: Inhibition of virus production by lauric acid. *Arch. Virol.* **2001**, *146*, 777–790, doi:10.1007/s007050170146.
177. Shilling, M.; Matt, L.; Rubin, E.; Visitacion, M.P.; Haller, N.A.; Grey, S.F.; Woolverton, C.J. Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium*

- difficile*. *J. Med. Food* **2013**, *16*, 1079–1085, doi:10.1089/jmf.2012.0303.
178. Fortuoso, B.F.; dos Reis, J.H.; Gebert, R.R.; Barreta, M.; Griss, L.G.; Casagrande, R.A.; de Cristo, T.G.; Santiani, F.; Campigotto, G.; Rampazzo, L.; et al. Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. *Microb. Pathog.* **2019**, *129*, 161–167, doi:10.1016/j.micpath.2019.02.005.
179. Liang, C.; Gao, W.; Ge, T.; Tan, X.; Wang, J.; Liu, H.; Wang, Y.; Han, C.; Xu, Q.; Wang, Q. Lauric acid is a potent biological control agent that damages the cell membrane of phytophthora sojae. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1–9, doi:10.3389/fmicb.2021.666761.
180. Lanzuise, S.; Manganiello, G.; Guastaferrò, V.M.; Vincenzo, C.; Vitaglione, P.; Ferracane, R.; Vecchi, A.; Vinale, F.; Kamau, S.; Lorito, M.; et al. Combined biostimulant applications of *Trichoderma* spp. with fatty acid mixtures improve biocontrol activity, horticultural crop yield and nutritional quality. *Agronomy* **2022**, *12*, 1–22, doi:10.3390/agronomy12020275.
181. Leyva, M.O.; Vicedo, B.; Finiti, I.; Flors, V.; Del Amo, G.; Real, M.D.; García-Agustín, P.; González-Bosch, C. Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. *Plant Pathol.* **2008**, *57*, 1038–1046, doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01891.x.
182. Liu, S.; Ruan, W.; Li, J.; Xu, H.; Wang, J.; Gao, Y.; Wang, J. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia* **2008**, *166*, 93–102, doi:10.1007/s11046-008-9124-1.
183. FAO *The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all*; FAO, Rome, Italy, 2016, P:1-200; ISBN 978-92-5-109185-2.
184. Luis, A.I.S.; Campos, E.V.R.; de Oliveira, J.L.; Fraceto, L.F. Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control. *Rev. Aquac.* **2019**, *11*, 119–132, doi:10.1111/raq.12229.
185. Cabello, F.C.; Godfrey, H.P.; Buschmann, A.H.; Dölz, H.J. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, e127–e133, doi:10.1016/S1473-3099(16)00100-6.
186. Romero-Lorente, M.Á.; Fabrikov, D.; Montes, J.; Morote, E.; Barroso, F.G.; Vargas-García, M.D.C.; Varga, Á.T.; Sánchez-Muros, M.J. Pre-treatment of fish by-products to optimize feeding of *Tenebrio molitor* L. larvae. *Insects* **2022**, *13*, 1–13, doi:10.3390/insects13020125.
187. Kaskhedikar, M.; Chhabra, D. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Vet. World* **2010**, *3*, 76–77.

188. Igbiosa, I.H.; Igumbor, E.U.; Aghdasi, F.; Tom, M.; Okoh, A.I. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Sci. World J.* **2012**, 1–13, doi:10.1100/2012/625023.
189. Martin-Carnahan, A.; Joseph, S.; Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*; Springer, New York, NY, USA, 2005; Volume 2, Part B, 2005; pp. 556–578.
190. Austin, B.; Austin, D.A. *Aeromonadaceae* representatives (motile *Aeromonads*). In *Bacterial Fish Pathogens*; Springer, Dordrecht, Netherlands, 2012; pp. 119–146.
191. Janda, J.M.; Abbott, S.L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 35–73, doi:10.1128/CMR.00039-09.
192. Lin, B.; Chen, S.; Cao, Z.; Lin, Y.; Mo, D.; Zhang, H.; Gu, J.; Dong, M.; Liu, Z.; Xu, A. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 295–301, doi:10.1016/j.molimm.2006.03.001.
193. Dahanayake, P.S.; Hossain, S.; Wickramanayake, M.V.K.S.; Heo, G.J. Antibiotic and heavy metal resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from marketed Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Korea. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 941–952, doi:10.1111/jam.14355.
194. Dallaire-Dufresne, S.; Tanaka, K.H.; Trudel, M. V.; Lafaille, A.; Charette, S.J. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 1–7.
195. Kang, C.H.; Shin, Y.J.; Kim, W.R.; Kim, Y.G.; Song, K.C.; Oh, E.G.; Kim, S.K.; Yu, H.S.; So, J.S. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 918–926, doi:10.1007/s11356-015-5650-9.
196. Gastalho, S.; Silva, G.J.; Ramos, F. Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact. *Acta Farm. Port.* **2014**, *3*, 29–45.
197. Henriques, I.S.; Fonseca, F.; Alves, A.; Saavedra, M.J.; Correia, A. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 938–947, doi:10.1016/j.resmic.2006.09.003.
198. Johann, D.D Pitout Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, *8*, 159–166, doi:10.1016/s1473-3099(08)70041-0.

199. Carvalho, M.J.; Martínez-Murcia, A.; Esteves, A.C.; Correia, A.; Saavedra, M.J. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *159*, 230–239, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.008.
200. Nawaz, M.; Sung, K.; Khan, S.A.; Khan, A.A.; Steele, R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 6461–6466, doi:10.1128/AEM.00271-06.
201. Ndi, O.L.; Barton, M.D. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J. Fish Dis.* **2011**, *34*, 589–599, doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01272.x.
202. Hernould, M.; Gagné, S.; Fournier, M.; Quentin, C.; Arpin, C. Role of the AheABC efflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1559–1563, doi:10.1128/AAC.01052-07.
203. Odeyemi, O.A.; Ahmad, A. Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources. *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *24*, 65–70, doi:10.1016/j.sjbs.2015.09.016.
204. Aravena-Román, M.; Inglis, T.J.J.; Henderson, B.; Riley, T. V.; Chang, B.J. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1110–1112, doi:10.1128/AAC.05387-11.
205. Vila, J.; Ruiz, J.; Gallardo, F.; Vargas, M.; Soler, L.; Figueras, M.J.; Gascon, J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical features and antimicrobial resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 552–555, doi:10.3201/eid0905.020451.
206. Khor, W.C.; Puah, S.M.; Koh, T.H.; Tan, J.A.M.A.; Puthucheary, S.D.; Chua, K.H. Comparison of clinical isolates of *Aeromonas* from singapore and malaysia with regard to molecular identification, virulence, and antimicrobial profiles. *Microb. Drug Resist.* **2018**, *24*, 469–478, doi:10.1089/mdr.2017.0083.
207. Zhou, H.; Gai, C.; Ye, G.; An, J.; Liu, K.; Xu, L.; Cao, H. *Aeromonas hydrophila*, an emerging causative agent of freshwater-farmed whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms* **2019**, *7*, 1–20, doi:10.3390/microorganisms7100450.
208. Dias, C.; Borges, A.; Saavedra, M.J.; Simões, M. Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. from wild animals. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2018**, *12*, 227–234,

doi:10.1016/j.jgar.2017.09.010.

209. Winton, J.R. Fish diseases: Prevention and control strategies. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-54.3.000> **2018**, *54*, 653–654, doi:10.7589/0090-3558-54.3.000.
210. Pereira, C.; Duarte, J.; Costa, P.; Braz, M.; Almeida, A. Bacteriophages in the control of *Aeromonas* sp. in aquaculture systems: An integrative view. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–33, doi:10.3390/antibiotics11020163.
211. Papuc, T.; Boaru, A.; Ladosi, D.; Struti, D.; Georgescu, B. Potential of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as alternative protein source in *Salmonid* feeds - A review. *Indian J. Fish.* **2020**, *67*, 160–170, doi:10.21077/ijf.2020.67.4.100172-20.
212. Tippayadara, N.; Dawood, M.A.O.; Krutmuang, P.; Hoseinifar, S.H.; Doan, H. Van; Paolucci, M. Replacement of fish meal by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal: Effects on growth, haematology, and skin mucus immunity of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Animals* **2021**, *11*, 1–19, doi:10.3390/ani11010193.
213. Sumbule, E.K.; Ambula, M.K.; Osuga, I.M.; Changeh, J.G.; Mwangi, D.M.; Subramanian, S.; Salifu, D.; Alaru, P.A.O.; Githinji, M.; Van Loon, J.J.A.; et al. Cost-effectiveness of black soldier fly larvae meal as substitute of fishmeal in diets for layer chicks and growers. *Sustain.* **2021**, *13*, 1–20, doi:10.3390/su13116074.
214. Makkar, H.P.S. Review: Feed demand landscape and implications of food-not feed strategy for food security and climate change. *Animal* **2018**, *12*, 1744–1754, doi:10.1017/S175173111700324X.
215. Wang, Y.-S.; Shelomi, M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods* **2017**, *6*, 1–23, doi:10.3390/foods6100091.
216. Erickson, M.C.; Islam, M.; Sheppard, C.; Liao, J.; Doyle, M.P. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 685–690, doi:10.4315/0362-028X-67.4.685.
217. Lee, J.; Kim, Y.M.; Park, Y.K.; Yang, Y.C.; Jung, B.G.; Lee, B.J. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae enhances immune activities and increases survivability of broiler chicks against experimental infection of *Salmonella Gallinarum*. *J. Vet. Med. Sci.* **2018**, *80*, 736–740, doi:10.1292/jvms.17-0236.
218. do Couto, M.V.S.; da Costa Sousa, N.; Paixão, P.E.G.; dos Santos Medeiros, E.; Abe, H.A.; Meneses, J.O.; Cunha, F.S.; Filho, R.M.N.; de Sousa, R.C.; Maria, A.N.; et al. Is there

- antimicrobial property of coconut oil and lauric acid against fish pathogen? *Aquaculture* **2021**, *545*, 1–6, doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737234.
219. Giovagnoni, G.; Tugnoli, B.; Piva, A.; Grilli, E. Dual antimicrobial effect of medium-chain fatty acids against an Italian multidrug resistant *Brachyspira hyodysenteriae* strain. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1–11, doi:10.3390/MICROORGANISMS10020301.
 220. Vidyasagar, G.M. Plant-derived antifungal agents: past and recent developments. In *Recent trends in antifungal agents and antifungal therapy*; Basak Amit, Ranadhir, C., Mandal, S.M., Eds.; Springer India, 2016; pp. 123–147 ISBN 9788132227823.
 221. Khameneh, B.; Iranshahy, M.; Soheili, V.; Fazly Bazzaz, B.S. Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2019**, *8*, 1–28, doi:10.1186/s13756-019-0559-6.
 222. Hofer, U. The cost of antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol* **2019**, *37*, 3–15, doi:10.1038/s41579-018-0125-x.
 223. Bhagirath, A.Y.; Li, Y.; Patidar, R.; Yerex, K.; Ma, X.; Kumar, A.; Duan, K. Two component regulatory systems and antibiotic resistance in Gram-negative pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–30, doi:10.3390/ijms20071781.
 224. Cheng, P.; Li, F.; Liu, R.; Yang, Y.; Xiao, T.; Ishfaq, M.; Xu, G.; Zhang, X. Prevalence and molecular epidemiology characteristics of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Heilongjiang province, China. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 2505–2518, doi:10.2147/IDR.S208122.
 225. Cui, X.; Zhang, H.; Du, H. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Detection and antimicrobial therapy. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–12, doi:10.3389/fmicb.2019.01823.
 226. Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M.I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M.H.; Nisar, M.A.; Alvi, R.F.; Aslam, M.A.; Qamar, M.U.; et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 1645–1658, doi:10.2147/IDR.S173867.
 227. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327, doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
 228. Singh, S.B.; Young, K.; Silver, L.L. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 63–73, doi:10.1016/j.bcp.2017.01.003.

229. Joseph, L.; Merciecca, T.; Forestier, C.; Balestrino, D.; Miquel, S. From *Klebsiella pneumoniae* colonization to dissemination: An overview of studies implementing murine models. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1–29, doi:10.3390/microorganisms9061282.
230. Algammal, A.M.; Hetta, H.F.; Batiha, G.E.; Hozzein, W.N.; El Kazzaz, W.M.; Hashem, H.R.; Tawfik, A.M.; El-Tarabili, R.M. Virulence-determinants and antibiotic-resistance genes of MDR-*E. coli* isolated from secondary infections following FMD-outbreak in cattle. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13, doi:10.1038/s41598-020-75914-9.
231. Algammal, A.M.; Hetta, H.F.; Elkelish, A.; Alkhalifah, D.H.H.; Hozzein, W.N.; Batiha, G.E.S.; Nahhas, N. El; Mabrok, M.A. Methicillin-resistant *Saphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 3255–3265, doi:10.2147/IDR.S272733.
232. Doorduyn, D.J.; Rooijackers, S.H.M.; van Schaik, W.; Bardoel, B.W. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology* **2016**, *221*, 1102–1109, doi:10.1016/j.imbio.2016.06.014.
233. Lev, A.I.; Astashkin, E.I.; Kislichkina, A.A.; Solovieva, E. V.; Kombarova, T.I.; Korobova, O. V.; Ershova, O.N.; Alexandrova, I.A.; Malikov, V.E.; Bogun, A.G.; et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health* **2018**, *112*, 142–151, doi:10.1080/20477724.2018.1460949.
234. Wang, C.; Xia, W.; Jiang, Q.; Xu, Y.; Yu, P. Protective effects of lipid extract from brains of silver carp against oxidative damage in HEK-293 cells. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 30855–30861, doi:10.1039/c7ra00362e.
235. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100.*; 28th ed.; Wayne, Pennsylvania, USA, 2018, pp. 1-296; ISBN 156238838X.
236. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
237. Xu, Q.; Yang, X.; Chan, E.W.C.; Chen, S. The hypermucoviscosity of hypervirulent *K. pneumoniae* confers the ability to evade neutrophil-mediated phagocytosis. *Virulence* **2021**, *12*, 2050–2059, doi:10.1080/21505594.2021.1960101.

238. Sánchez-López, J.; García-Caballero, A.; Navarro-San Francisco, C.; Quereda, C.; Ruiz-Garbajosa, P.; Navas, E.; Dronda, F.; Morosini, M.I.; Cantón, R.; Díez-Aguilar, M. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: A challenge in community acquired infection. *IDCases* **2019**, *17*, 1–3, doi:10.1016/j.idcr.2019.e00547.
239. Oliveira, C.S.D.; Moreira, P.; Resende, J.; Cruz, M.T.; Pereira, C.M.F.; Silva, A.M.S.; Santos, S.A.O.; Silvestre, A.J.D. Characterization and cytotoxicity assessment of the lipophilic fractions of different morphological parts of *Acacia dealbata*. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9–11, doi:10.3390/ijms21051814.
240. Petropoulos, S.A.; Fernandes, Â.; Calhelha, R.C.; Roupael, Y.; Petrović, J.; Soković, M.; Ferreira, I.C.F.R.; Barros, L. Antimicrobial properties, cytotoxic effects, and fatty acids composition of vegetable oils from purslane, linseed, luffa, and pumpkin seeds. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1–16, doi:10.3390/app11125738.
241. Vilakazi, H.; Olasehinde, T.A.; Olaniran, A.O. Chemical characterization, antiproliferative and antioxidant activities of polyunsaturated fatty acid-rich extracts from *Chlorella* sp. s14. *Molecules* **2021**, *26*, 1–13, doi:10.3390/molecules26144109.
242. Choi, W.H.; Yun, J.H.; Chu, J.P.; Chu, K.B. Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (diptera: *Stratiomyidae*) larvae against gram-negative bacteria. *Entomol. Res.* **2012**, *42*, 219–226, doi:10.1111/j.1748-5967.2012.00465.x.
243. Park, K.H.; Kwak, K.W.; Nam, S.H.; Choi, J.Y.; Hyun, S.; Kim, H.G.; Kim, S.H. Antibacterial activity of larval extract from the black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera: *Stratiomyidae*) against plant pathogens. *J. Entomol. Zool. Stud.* **2015**, *3*, 176–179, doi:10.1111/j.1748-5967.2012.00465.
244. Sledz, W.; Los, E.; Paczek, A.; Rischka, J.; Motyka, A.; Zoledowska, S.; Piosik, J.; Lojkowska, E. Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria. *Acta Biochim. Pol.* **2015**, *62*, 605–612, doi:10.18388/abp.2015_1092.
245. Hong, H.; Lee, J.H.; Kim, S.K. Phytochemicals and antioxidant capacity of some tropical edible plants. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **2018**, *31*, 1677–1684, doi:10.5713/ajas.17.0903.
246. Teh, C.H.; Nazni, W.A.; Nurulhusna, A.H.; Norazah, A.; Lee, H.L. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 1–8, doi:10.1186/s12866-017-0936-3.
247. Canche-Escamilla, G.; Colli-Acevedo, P.; Borges-Argaez, R.; Quintana-Owen, P.; May-Crespo,

- J.F.; Cáceres-Farfan, M.; Yam Puc, J.A.; Sansores-Peraza, P.; Vera-Ku, B.M. Extraction of phenolic components from an *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) crop and their potential as antimicrobials and textile dyes. *Sustain. Chem. Pharm.* **2019**, *14*, 1–8, doi:10.1016/j.scp.2019.100168.
248. Soberón, J.R.; Sgariglia, M.A.; Dip Maderuelo, M.R.; Andina, M.L.; Sampietro, D.A.; Vattuone, M.A. Antibacterial activities of *Ligaria cuneifolia* and *Jodina rhombifolia* leaf extracts against phytopathogenic and clinical bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *118*, 599–605, doi:10.1016/j.jbiosc.2014.04.018.
249. Meziani, S.; Oomah, B.D.; Zaidi, F.; Simon-Levert, A.; Bertrand, C.; Zaidi-Yahiaoui, R. Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*. *Microb. Pathog.* **2015**, *78*, 95–102, doi:10.1016/j.micpath.2014.12.001.
250. Glenz, R.; Kaiping, A.; Göpfert, D.; Weber, H.; Lambour, B.; Sylvester, M.; Fröschel, C.; Mueller, M.J.; Osman, M.; Waller, F. The major plant sphingolipid long chain base phytosphingosine inhibits growth of bacterial and fungal plant pathogens. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1–9, doi:10.1038/s41598-022-05083-4.
251. Sneddon, J.; Masuram, S.; Richert, J.C. Gas chromatography-mass spectrometry-basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 1003–1012, doi:10.1080/00032710701300648.
252. Mani, D.; Kalpana, M.S.; Patil, D.J.; Dayal, A.M. Organic matter in gas shales: origin, evolution, and characterization. In *Shale gas: Exploration and environmental and economic impacts*; Elsevier Inc, 2017, pp.25-54 ISBN 9780128095355.
253. Roberts, L.D.; McCombie, G.; Titman, C.M.; Griffin, J.L. A matter of fat: An introduction to lipidomic profiling methods. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *871*, 174–181, doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.002.
254. Ecker, J.; Scherer, M.; Schmitz, G.; Liebisch, G. A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *897*, 98–104, doi:10.1016/j.jchromb.2012.04.015.
255. Sugumaran, M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* **2002**, *15*, 2–9, doi:10.1034/j.1600-0749.2002.00056.x.

256. Park, K.H.; Zeon, S.R.; Lee, J.G.; Choi, S.H.; Shin, Y.K.; Park, K.I. *In vitro* and *in vivo* efficacy of drugs against the protozoan parasite *Azumiobodo hoyamushi* that causes soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi* (Drasche). *J. Fish Dis.* **2014**, *37*, 309–317, doi:10.1111/jfd.12104.
257. Ewald, N.; Vidakovic, A.; Langeland, M.; Kiessling, A.; Sampels, S.; Lalander, C. Fatty acid composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) – Possibilities and limitations for modification through diet. *Waste Manag.* **2020**, *102*, 40–47, doi:10.1016/j.wasman.2019.10.014.
258. Meneguz, M.; Schiavone, A.; Gai, F.; Dama, A.; Lussiana, C.; Renna, M.; Gasco, L. Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 5776–5784, doi:10.1002/jsfa.9127.
259. Kotan, R.; Cakir, A.; Ozer, H.; Kordali, S.; Cakmakci, R.; Dadasoglu, F.; Dikbas, N.; Aydin, T.; Kazaz, C. Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2014**, *172*, 210–220, doi:10.1016/j.scienta.2014.03.016.
260. Shea, K.M. Antibiotic resistance: What is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? *Pediatrics* **2003**, *112*, 253–258.
261. Sumayo, M.S.; Kwon, D.K.; Ghim, S.Y. Linoleic acid-induced expression of defense genes and enzymes in tobacco. *J. Plant Physiol.* **2014**, *171*, 1757–1762, doi:10.1016/j.jplph.2014.08.015.
262. Skřivanová, E.; Molatová, Z.; Marounek, M. Effects of caprylic acid and triacylglycerols of both caprylic and capric acid in rabbits experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Vet. Microbiol.* **2008**, *126*, 372–376, doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.010.
263. Cohen, Y.; Gisi, U.; Mosinger, E. Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1991**, *38*, 255–263, doi:10.1016/S0885-5765(05)80117-1.
264. Bleichert, S.; Brodschelm, W.; Hölder, S.; Kammerer, L.; Kutchan, T.M.; Mueller, M.J.; Xia, Z.Q.; Zenk, M.H. The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 4099–4105, doi:10.1073/pnas.92.10.4099.
265. Farmer, E.E.; Ryan, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **1992**, *4*, 129–134, doi:10.1105/tpc.4.2.129.
266. Kumar, P.P.; Kumaravel, S.; Lalitha, C. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-

- MS study of *Vitex negundo*. *African J. Biochem. Res.* **2010**, *4*, 191–195.
267. Awa, E.P.; Ibrahim, S.; Ameh, D.A. GC/MS Analysis and Antimicrobial activity of Diethyl ether fraction of methanolic extract from the stem bark of *Annona senegalensis* pers. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, *3*, 4213–4218, doi:http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(11).4213-18.
268. Ouattara, B.; Simard, R.E.; Holley, R.A.; Piette, G.J.P.; Bégin, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* **1997**, *37*, 155–162, doi:10.1016/S0168-1605(97)00070-6.
269. Nair, R.R. Agnihotra Yajna: A prototype of south Asian traditional medical knowledge. *JAMS J. Acupunct. Meridian Stud.* **2017**, *10*, 143–150, doi:10.1016/j.jams.2016.11.002.
270. Rahuman, A.A.; Gopalakrishnan, G.; Ghouse, B.S.; Arumugam, S.; Himalayan, B. Effect of *Feronia limonia* on mosquito larvae; Elsevier, 2000; Vol. 71;553-555.
271. Khalil, A.S.; Rahim, A.A.; Taha, K.K.; Abdallah, K.B. Characterization of methanolic extracts of agarwood leaves. *J. Appl. Ind. Sci.* **2013**, *1*, 78–88.
272. Duke, J.A. *Handbook of biologically active phytochemicals and their activities*; 1 st editi.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, Florida, USA, 1992, pp. 1-182; ISBN 9780849336706.
273. Chandrasekaran, M.; Kannathasan, K.; Venkatesalu, V. Antimicrobial activity of fatty acid methyl esters of some members of *Chenopodiaceae*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2008**, *63*, 331–336, doi:10.1515/znc-2008-5-604.
274. Enig, M.G. *Lauric oils as antimicrobial agents: theory of effect, scientific rationale, and dietary application as adjunct nutritional support for HIV-infected individuals* In: *Nutrients and foods in AIDS*; Watson, R.R., Ed.; 1 st.; CRC Press, 1998, pp. 81-97;
275. Pinto, M.E.A.; Araújo, S.G.; Morais, M.I.; Sá, N.P.; Lima, C.M.; Rosa, C.A.; Siqueira, E.P.; Johann, S.; Lima, L.A.R.S. Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2017**, *89*, 1671–1681, doi:10.1590/0001-3765201720160908.
276. Sahin, N.; Kula, I.; Erdogan, Y. Investigation of antimicrobial activities of nonanoic acid derivatives. *Fresenius Environ. Bull.* **2006**, *15*, 141–143.
277. Chandrasekaran, M.; Senthilkumar, A.; Venkatesalu, V. Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2011**, *15*, 775–780.

278. Abou-Elela, G.M.; Abd-Elnaby, H.; Ibrahim, H.A.H.; Okbah, M.A. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *World Appl. Sci. J.* **2009**, *7*, 872–880.
279. McGaw, L.J.; Jäger, A.K.; Van Staden, J. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African J. Bot.* **2002**, *68*, 417–423, doi:10.1016/S0254-6299(15)30367-7.
280. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. CLSI document M07-A10.; 10th ed.; Wayne, Pennsylvania, USA, 2015; P: 27-29 ISBN 1562389874.
281. Wamala, S.P.; Mugimba, K.K.; Mutoloki, S.; Evensen, O.; Mdegela, R.; Byarugaba, D.K.; Sørum, H. Occurrence and antibiotic susceptibility of fish bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and *Clarias gariepinus* (African catfish) in Uganda. *Fish. Aquat. Sci.* **2018**, *21*, 1–10, doi:10.1186/s41240-017-0080-x.
282. Yang, C.; Song, G.; Lim, W. A review of the toxicity in fish exposed to antibiotics. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C* **2020**, *Part C 237*, 1–12, doi:10.1016/j.cbpc.2020.108840.
283. El-Saber Batiha, G.; Hussein, D.E.; Algammal, A.M.; George, T.T.; Jeandet, P.; Al-Snafi, A.E.; Tiwari, A.; Pagnossa, J.P.; Lima, C.M.; Thorat, N.D.; et al. Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. *Food Control* **2021**, *126*, 1–14, doi:10.1016/j.foodcont.2021.108066.
284. Yin, Z.; Zhu, L.; Li, S.; Hu, T.; Chu, R.; Mo, F.; Hu, D.; Liu, C.; Li, B. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresour. Technol.* **2020**, *301*, 1–19, doi:10.1016/j.biortech.2020.122804.
285. Rangel-López, L.; Zaragoza-Bastida, A.; Valladares-Carranza, B.; Peláez-Acero, A.; Sosa-Gutiérrez, C.G.; Hetta, H.F.; Batiha, G.E.S.; Alqahtani, A.; Rivero-Perez, N. In vitro antibacterial potential of *Salix babylonica* extract against bacteria that affect *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis* spp. *Animals* **2020**, *10*, 1–10, doi:10.3390/ani10081340.
286. Wei, L.S.; Wee, W.; Siong, J.Y.F.; Syamsumir, D.F. Characterization of antimicrobial, antioxidant, anticancer property and chemical composition of *Michelia champaca* seed and flower extracts. *Stamford J. Pharm. Sci.* **2011**, *4*, 19–24, doi:10.3329/sjps.v4i1.8862.
287. Marimuthu, K.; Gunaselvam, P.; Rahman, M.A.; Xavier, R.; Arockiaraj, J.; Subramanian, S.; Yusoff, F.M.; Arshad, A. Antibacterial activity of ovary extract from sea urchin *Diadema*

- setosum*. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2015**, *19*, 1895–1899.
288. Yin, L.; Chen, J.; Wang, K.; Geng, Y.; Lai, W.; Huang, X.; Chen, D.; Guo, H.; Fang, J.; Chen, Z.; et al. Study the antibacterial mechanism of cinnamaldehyde against drug-resistant *Aeromonas hydrophila* in vitro. *Microb. Pathog.* **2020**, *145*, 1–7, doi:10.1016/j.micpath.2020.104208.
289. Zhang, H.; Ge, X.; Liu, B.; Teng, T.; Zhou, Q.; Sun, C.; Song, C. Comparative transcriptomic and proteomic analysis of the antibacterial activity of emodin on *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* **2020**, *529*, 1–14, doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735589.
290. Schrader, K.K.; Ibrahim, M.A.; Abd-Alla, H.I.; Cantrell, C.L.; Pasco, D.S. Antibacterial activities of metabolites from *Vitis rotundifolia* (muscadine) roots against fish pathogenic bacteria. *Molecules* **2018**, *23*, 1–8, doi:10.3390/molecules23112761.
291. Kot, B.; Kwiatek, K.; Janiuk, J.; Witeska, M.; Pękala-Safińska, A. Antibacterial activity of commercial phytochemicals against *Aeromonas* species isolated from fish. *Pathogens* **2019**, *8*, 1–12, doi:10.3390/pathogens8030142.
292. Rangel-López, L.; Rivero-Perez, N.; Valladares-Carranza, B.; Olmedo-Juárez, A.; Delgadillo-Ruiz, L.; Vega-Sánchez, V.; Hori-Oshima, S.; Nassan, M.A.; Batiha, G.E.-S.; Zaragoza-Bastida, A. Antibacterial potential of *Caesalpinia coriaria* (Jacq) willd fruit against *Aeromonas* spp. of aquaculture importance. *Animals* **2022**, *12*, 1–12, doi:10.3390/ani12040511.
293. Sabarinathan, D.; Vanaraj, S.; Sathiskumar, S.; Poorna Chandrika, S.; Sivarasan, G.; Arumugam, S.S.; Preethi, K.; Li, H.; Chen, Q. Characterization and application of rhamnolipid from *Pseudomonas plecoglossicida* BP03. *Lett. Appl. Microbiol.* **2021**, *72*, 251–262, doi:10.1111/lam.13403.
294. Ouyang, P.; Chen, J.; Yin, L.; Geng, Y.; Chen, D.; Wang, K.; Lai, W.; Guo, H.; Fang, J.; Chen, Z.; et al. The sub-inhibitory concentration of cinnamaldehyde resists *Aeromonas hydrophila* pathogenicity via inhibition of W-pili production. *Aquac. Int.* **2021**, *29*, 1639–1655, doi:10.1007/s10499-021-00705-6.
295. Dong, J.; Zhang, D.; Li, J.; Liu, Y.; Zhou, S.; Yang, Y.; Xu, N.; Yang, Q.; Ai, X. Genistein inhibits the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* by disrupting quorum sensing mediated biofilm formation and aerolysin production. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 1–10, doi:10.3389/fphar.2021.753581.
296. Brahmachari, G. Discovery and development of neuroprotective agents from natural products: An overview. In *Discovery and development of neuroprotective agents from natural products*;

Elsevier Inc, 2017, pp. 1-7 ISBN 978-0-12-809593-5.

297. Mai, H.C.; Dao, N.D.; Lam, T.D.; Nguyen, B.V.; Nguyen, D.C.; Bach, L.G. Purification process, physicochemical properties, and fatty acid composition of black soldier fly (*Hermetia illucens* Linnaeus) larvae oil. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **2019**, *96*, 1303–1311, doi:10.1002/aocs.12263.
298. Rabani, V.; Cheatsazan, H.; Davani, S. Proteomics and lipidomics of black soldier fly (Diptera: *Stratiomyidae*) and blow fly (Diptera: *Calliphoridae*) larvae. *J. Insect Sci.* **2019**, *19*, 1–9, doi:10.1093/jisesa/iez050.
299. Imbimbo, P.; Romanucci, V.; Pollio, A.; Fontanarosa, C.; Amoresano, A.; Zarrelli, A.; Olivieri, G.; Monti, D.M. A cascade extraction of active phycocyanin and fatty acids from *Galdieria phlegrea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 9455–9464, doi:10.1007/s00253-019-10154-0.
300. Bahadi, M.; Yusoff, M.F.; Salimon, J.; Al-Wali Japir, A.; Derawi, D. Optimization of low-temperature methanol crystallization for unsaturated fatty acids separation from crude palm fatty acids mixture using response surface methodology. *Asian J. Chem.* **2019**, *31*, 1617–1625, doi:10.14233/ajchem.2019.21974.
301. Dana, D.; Blumenthal, M.M.; Saguy, I.S. The protective role of water injection on oil quality in deep fat frying conditions. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 104–109, doi:10.1007/s00217-003-0744-x.
302. Bergsson, G.; Steingrímsson, Ó.; Thormar, H. In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2790–2792, doi:10.1128/aac.43.11.2790.
303. Fischer, C.L. Antimicrobial activity of host-derived lipids. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1–17, doi:10.3390/antibiotics9020075.
304. Thirunavukarasu, N.; Panda, R.C. Modeling, identification, and control for the production of glycerol by the hydrolysis of tallow. *Rev. Chem. Eng.* **2015**, *31*, 345–359, doi:10.1515/revce-2014-0047.
305. Naz, S.; Siddiqi, R.; Sheikh, H.; Sayeed, S.A. Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 127–134, doi:10.1016/j.foodres.2004.08.002.
306. Van Gerpen, J.; Knothe, G. Biodiesel Production. In *The Biodiesel Handbook*; AOCS Press, USA,

- 2010; pp. 31–96.
307. Saegeman, V.S.M.; Ectors, N.L.; Lismont, D.; Verduyckt, B.; Verhaegen, J. Short- and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. *Burns* **2008**, *34*, 205–211, doi:10.1016/j.burns.2007.02.009.
 308. Singh, B.R. Antibacterial activity of glycerol, lactose, maltose, mannitol, raffinose and xylose. *Noto-are* **2014**, *7*, 1–3.
 309. Duc Nguyen, T.; Casareto, B.E.; Ramphul, C.; Toyoda, K.; Suzuki, T.; Fujiwara, T.; Suzuki, Y. Glycerol enhances growth and antimicrobial properties of selected *Vibrio* bacteria associated with the coral *Montipora digitata*. *Res. J. Microbiol.* **2018**, *13*, 127–137, doi:10.3923/jm.2018.127.137.
 310. Sabri, N.A.; Schmitt, H.; Van Der Zaan, B.; Gerritsen, H.W.; Zuidema, T.; Rijnaarts, H.H.M.; Langenhoff, A.A.M. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *J. Environ. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 1–11, doi:10.1016/j.jece.2018.03.004.
 311. Le, T.; Wang, L.; Zeng, C.; Fu, L.; Liu, Z.; Hu, J. Clinical and microbiological characteristics of nosocomial, healthcare-associated, and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in Guangzhou, China. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2021**, *10*, 1–11, doi:10.1186/s13756-021-00910-1.
 312. Giedraitiene, A.; Vitkauskiene, A.; Naginiene, R.; Pavilonis, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (B. Aires)*. **2011**, *47*, 137–146, doi:10.3390/medicina47030019.
 313. Kareem, S.M.; Al-Kadmy, I.M.S.; Kazaal, S.S.; Ali, A.N.M.; Aziz, S.N.; Makharita, R.R.; Algammal, A.M.; Al-Rejaie, S.; Behl, T.; Batiha, G.E.S.; et al. Detection of *gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 555–563, doi:10.2147/IDR.S275852.
 314. Bhatia, P.; Sharma, A.; George, A.J.; Anvitha, D.; Kumar, P.; Dwivedi, V.P.; Chandra, N.S. Antibacterial activity of medicinal plants against ESKAPE: An update. *Heliyon* **2021**, *7*, 1–12, doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06310.
 315. Karaiskos, I.; Lagou, S.; Pontikis, K.; Rapti, V.; Poulakou, G. The “Old” and the “New” antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. *Front. Public Heal.* **2019**, *7*, 1–25, doi:10.3389/fpubh.2019.00151.
 316. Jain, N.; Jansone, I.; Obidenova, T.; Simanis, R.; Meisters, J.; Straupmane, D.; Reinis, A.

- Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of gram-negative bacteria: Public health implications in the latvian context. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1–19, doi:10.3390/antibiotics10070791.
317. Hu, Y.; Liu, Y.; Coates, A. Azidothymidine produces synergistic activity in combination with colistin against antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother* **2019**, *63*, 1–11, doi:10.1128/AAC.01630-18.
318. Venkata Mohan, S.; Rohit, M. V.; Chiranjeevi, P.; Chandra, R.; Navaneeth, B. Heterotrophic *Microalgae* cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresour. Technol.* **2015**, *184*, 169–178, doi:10.1016/j.biortech.2014.10.056.
319. kabara, J.J.; swieczkowski, D.M.; Conley, A.J.; Truant, J.P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *2*, 23–28.
320. Saviane, A.; Tassoni, L.; Naviglio, D.; Lupi, D.; Savoldelli, S.; Bianchi, G.; Cortellino, G.; Bondioli, P.; Folegatti, L.; Casartelli, M.; et al. Mechanical processing of *Hermetia illucens* larvae and *Bombyx mori* pupae produces oils with antimicrobial activity. *Animals* **2021**, *11*, 1–17, doi:10.3390/ani11030783.
321. Özçelik, B.; Aslan, M.; Orhan, I.; Karaoglu, T. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiol. Res.* **2005**, *160*, 159–164, doi:10.1016/j.micres.2004.11.002.
322. Shannon, E.; Abu-Ghannam, N. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 1–23, doi:10.3390/md14040081.
323. Potocki, L.; Oklejewicz, B.; Kuna, E.; Szpyrka, E.; Duda, M.; Zuczek, J. Application of green algal *Planktochlorella nurekis* biomasses to modulate growth of selected microbial species. *Molecules* **2021**, *26*, 1–19, doi:10.3390/molecules26134038.
324. Čermák, L.; Pražáková; Marounek, M.; Skřivan, M.; Skřivanová, E. Effect of green alga *Planktochlorella nurekis* on selected bacteria revealed antibacterial activity in vitro. *Czech J. Anim. Sci.* **2015**, *60*, 427–435, doi:10.17221/8522-CJAS.
325. Ismail, A.; Ktari, L.; Ben Redjem Romdhane, Y.; Aoun, B.; Sadok, S.; Boudabous, A.; El Bour, M. Antimicrobial fatty acids from green alga *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–12, doi:10.1155/2018/3069595.
326. El Shafay, S.M.; Ali, S.S.; El-Sheekh, M.M. Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. *Egypt. J. Aquat. Res.* **2016**, *42*, 65–74,

doi:10.1016/j.ejar.2015.11.006.

327. Supardy, N.A.; Ibrahim, D.; Sulaiman, S.F.; Zakaria, N.A. Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 cells by hexane extract of *Halimeda discoidea* (Decaisne) and the identification of its potential bioactive compounds. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*, 872–881, doi:10.4014/jmb.1111.11053.
328. Skalicka-Woźniak, K.; Los, R.; Głowniak, K.; Malm, A. Antimicrobial activity of fatty acids from fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum*. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 2748–2754, doi:10.1002/cbdv.201000008.
329. P. Desbois, A. Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agriculture and other industries. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2012**, *7*, 111–122, doi:10.2174/157489112801619728.
330. Desbois, A.P.; Lawlor, K.C. Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4544–4557, doi:10.3390/md11114544.
331. Duan, H.; Zhang, X.; Li, Z.; Yuan, J.; Shen, F.; Zhang, S. Synergistic effect and antibiofilm activity of an antimicrobial peptide with traditional antibiotics against multi-drug resistant bacteria. *Microb. Pathog.* **2021**, *158*, 1–8, doi:10.1016/j.micpath.2021.105056.
332. Liu, T.; Zhu, N.; Zhong, C.; Zhu, Y.; Gou, S.; Chang, L.; Bao, H.; Liu, H.; Zhang, Y.; Ni, J. Effect of N-methylated and fatty acid conjugation on analogs of antimicrobial peptide Anoplin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *152*, 1–18, doi:10.1016/j.ejps.2020.105453.
333. Armas, F.; Di Stasi, A.; Mardirossian, M.; Romani, A.A.; Benincasa, M.; Scocchi, M. Effects of lipidation on a proline-rich antibacterial peptide. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–14, doi:10.3390/ijms22157959.
334. Tian, Z.; Feng, Q.; Sun, H.; Liao, Y.; Du, L.; Yang, R.; Li, X.; Yang, Y.; Xia, Q. Isolation and purification of active antimicrobial peptides from *Hermetia illucens* L., and its effects on CNE2 cells. *bioRxiv* **2018**, *2018*, 1–42, doi:10.1101/353367.
335. Lee, K.S.; Yun, E.Y.; Goo, T.W. Antimicrobial activity of an extract of *Hermetia illucens* larvae immunized with *Lactobacillus casei* against *salmonella* species. *Insects* **2020**, *11*, 1–11, doi:10.3390/insects11100704.
336. Somaida, A.; Tariq, I.; Ambreen, G.; Abdelsalam, A.M.; Ayoub, A.M.; Wojcik, M.; Dzoyem, J.P.; Bakowsky, U. Potent cytotoxicity of four cameroonian plant extracts on different cancer cell

- lines. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 1–19, doi:10.3390/ph13110357.
337. Puttamreddy, S.; Cornick, N.A.; Minion, F.C. Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 2377–2384, doi:10.1128/IAI.00156-10.
338. Piperaki, E.T.; Syrogiannopoulos, G.A.; Tzouveleki, L.S.; Daikos, G.L. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 1002–1005, doi:10.1097/INF.0000000000001675.
339. Schmid, J.; Sieber, V.; Rehm, B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–24, doi:10.3389/FMICB.2015.00496.
340. Reza, A.; Mark Sutton, J.; Rahman, K.M. Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram-negative (ESKAPEE) bacteria. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **2019**, *8*, 1–19, doi:10.3390/ANTIBIOTICS8040229.
341. Chmielewska, S.J.; Skłodowski, K.; Piktel, E.; Suprewicz, Ł.; Fiedoruk, K.; Daniluk, T.; Wolak, P.; Savage, P.B.; Bucki, R. Ndm-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* are highly susceptible to ceragenins csa-13, csa-44, and csa-131. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 3277–3294, doi:10.2147/IDR.S261579.
342. Nirwati, H.; Sinanjung, K.; Fahrurissa, F.; Wijaya, F.; Napitupulu, S.; Hati, V.P.; Hakim, M.S.; Meliala, A.; Aman, A.T.; Nuryastuti, T. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proc.* **2019**, *13*, 1–9, doi:10.1186/s12919-019-0176-7.
343. Oleksy-Wawrzyniak, M.; Junka, A.; Brożyna, M.; Paweł, M.; Kwiec, B.; Nowak, M.; Mączyńska, B.; Bartoszewicz, M. The in vitro ability of *Klebsiella pneumoniae* to form biofilm and the potential of various compounds to eradicate it from urinary catheters. *Pathogens* **2022**, *11*, 1–24, doi:10.3390/pathogens11010042.
344. Right, C.; Alotaibi, G.F.; Bukhari, M.A. Factors influencing bacterial biofilm formation and development. *Am J Biomed Sci Res* *12*, 617–626, doi:10.34297/AJBSR.2021.12.001820.
345. Mohamed, H.; Marusich, E.; Afanasev, Y.; Leonov, S. Bacterial outer membrane permeability increase underlies the bactericidal effect of fatty acids from *Hermetia illucens* (Black soldier fly) larvae fat against hypermucoviscous isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol* **2022**, *13*, 1–19, doi:10.3389/fmicb.2022.844811.
346. Trunk, T.; S. Khalil, H.; C. Leo, J. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 140–164,

doi:10.3934/microbiol.2018.1.140.

347. Song, Y.J.; Yu, H.H.; Kim, Y.J.; Lee, N.K.; Paik, H.D. Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 1177–1183, doi:10.4014/JMB.1905.05022.
348. Shon, A.S.; Bajwa, R.P.S.; Russo, T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence* **2013**, *4*, 107–118, doi:10.4161/viru.22718.
349. Wu, M.C.; Lin, T.L.; Hsieh, P.F.; Yang, H.C.; Wang, J.T. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PLoS One* **2011**, *6*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0023500.
350. Zheng, J.X.; Lin, Z.W.; Chen, C.; Chen, Z.; Lin, F.J.; Wu, Y.; Yang, S.Y.; Sun, X.; Yao, W.M.; Li, D.Y.; et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of *wcaG*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 1–9, doi:10.3389/fcimb.2018.00021.
351. Yang, X.; Wai-Chi Chan, E.; Zhang, R.; Chen, S. A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 2039–2043, doi:10.1038/s41564-019-0566-7.
352. Xie, M.; Chen, K.; Ye, L.; Yang, X.; Xu, Q.; Yang, C.; Dong, N.; Chan, E.W.C.; Sun, Q.; Shu, L.; et al. Conjugation of virulence plasmid in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains through formation of a fusion plasmid. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, 1–10, doi:10.1002/adbi.201900239.
353. Choi, N.Y.; Bae, Y.M.; Lee, S.Y. Cell surface properties and biofilm formation of pathogenic bacteria. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*, 2257–2264, doi:10.1007/s10068-015-0301-y.
354. Chiarelli, A.; Cabanel, N.; Rosinski-Chupin, I.; Zongo, P.D.; Naas, T.; Bonnin, R.A.; Glaser, P. Diversity of mucoid to non-mucoid switch among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 1–14, doi:10.1186/s12866-020-02007-y.
355. Vishwakarma, J.; Waghela, B.; Falcao, B.; Vavilala, S.L. Algal polysaccharide's potential to combat respiratory infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* biofilms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2022**, *194*, 671–693, doi:10.1007/s12010-021-03632-7.
356. Nithyanand, P.; Beema Shafreen, R.M.; Muthamil, S.; Karutha Pandian, S. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. *Microbiol. Res.* **2015**, *179*, 20–28, doi:10.1016/j.micres.2015.06.009.
357. Tyfa, A.; Kunicka-Styczyńska, A.; Zabielska, J. Evaluation of hydrophobicity and quantitative

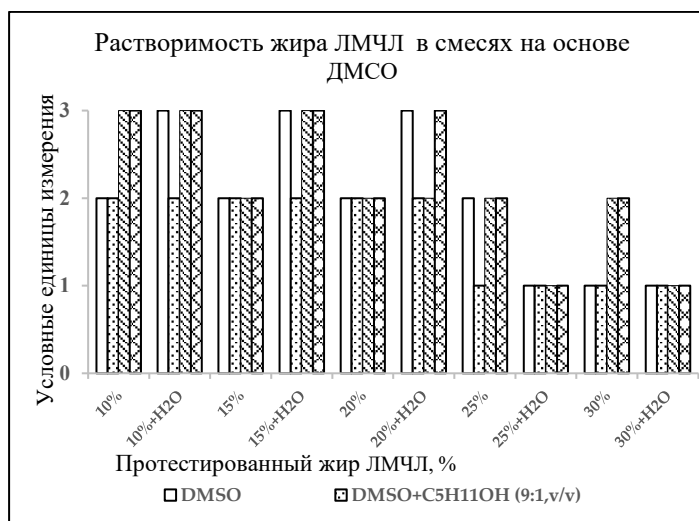
- analysis of biofilm formation by *Alicyclobacillus* sp. *Acta Biochim. Pol.* **2015**, *62*, 785–790, doi:10.18388/abp.2015_1133.
358. Sun, E.; Liu, S.; Hancock, R.E.W. Surfing motility: A conserved yet diverse adaptation among motile bacteria. *J. Bacteriol.* **2018**, *200*, 1–13, doi:10.1128/JB.00394-18.
359. Carabarin-Lima, A.; León-Izurieta, L.; del Carmen Rocha-Gracia, R.; Castañeda-Lucio, M.; Torres, C.; Gutiérrez-Cazarez, Z.; González-Posos, S.; Martínez de la Peña, C.F.; Martínez-Laguna, Y.; Lozano-Zarain, P. First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *J. Med. Microbiol.* **2016**, *65*, 729–737, doi:10.1099/jmm.0.000291.
360. Sharma, D.; Garg, A.; Kumar, M.; Rashid, F.; Khan, A.U. Down-regulation of flagellar, fimbriae, and pili proteins in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (NDM-4) clinical isolates: A novel linkage to drug resistance. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–9, doi:10.3389/FMICB.2019.02865/FULL.
361. Singh, V.K.; Kavita, K.; Prabhakaran, R.; Jha, B. Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling* **2013**, *29*, 855–867, doi:10.1080/08927014.2013.807914.
362. Balkrishna, A.; Gupta, A.K.; Singh, K.; Haldar, S.; Varshney, A. Effects of fatty acids in super critical fluid extracted fixed oil from *Withania somnifera* seeds on Gram-negative *Salmonella enterica* biofilms. *Phytomedicine Plus* **2021**, *1*, 1–11, doi:10.1016/j.phyplu.2021.100047.
363. Eder, A.E.; Munir, S.A.; Hobby, C.R.; Anderson, D.M.; Herndon, J.L.; Siv, A.W.; Symes, S.J.K.; Giles, D.K. Exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) alter phospholipid composition, membrane permeability, biofilm formation and motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiol. (United Kingdom)* **2017**, *163*, 1626–1636, doi:10.1099/mic.0.000556.
364. Kwiatkowski, P.; Sienkiewicz, M.; Pruss, A.; Łopusiewicz, Ł.; Arszyńska, N.; Wojciechowska-Koszko, I.; Kilanowicz, A.; Kot, B.; Dołęgowska, B. Antibacterial and anti-biofilm activities of essential oil compounds against New DelhiMetallo-β-lactamase-1-producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1–14, doi:10.3390/antibiotics11020147.
365. Galdiero, E.; Ricciardelli, A.; D'Angelo, C.; de Alteriis, E.; Maione, A.; Albarano, L.; Casillo, A.; Corsaro, M.M.; Tutino, M.L.; Parrilli, E. Pentadecanoic acid against *Candida albicans*-*Klebsiella pneumoniae* biofilm: towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections. *Res. Microbiol.* **2021**, *172*, 1–11, doi:10.1016/j.resmic.2021.103880.

366. Jiang, Y.; Geng, M.; Bai, L. Targeting biofilms therapy: Current research strategies and development hurdles. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1–34, doi:10.3390/microorganisms8081222.
367. Uppu, D.S.S.M.; Konai, M.M.; Sarkar, P.; Samaddar, S.; Fensterseifer, I.C.M.; Farias-Junior, C.; Krishnamoorthy, P.; Shome, B.R.; Franco, O.L.; Haldar, J. Membrane-active macromolecules kill antibiotic-tolerant bacteria and potentiate antibiotics towards Gram-negative bacteria. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–30, doi:10.1371/journal.pone.0183263.
368. Li, N.; Luo, M.; Fu, Y.J.; Zu, Y.G.; Wang, W.; Zhang, L.; Yao, L.P.; Zhao, C.J.; Sun, Y. Effect of corilagin on membrane permeability of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Phyther. Res.* **2013**, *27*, 1517–1523, doi:10.1002/ptr.4891.
369. Ivanov, M.; Gašić, U.; Stojković, D.; Kostić, M.; Mišić, D.; Soković, M. New evidence for *Artemisia absinthium* L. application in gastrointestinal ailments: ethnopharmacology, antimicrobial capacity, cytotoxicity, and phenolic profile. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2021**, *2021*, 1–14, doi:10.1155/2021/9961089.
370. Seukep, A.J.; Fan, M.; Sarker, S.D.; Kuete, V.; Guo, M.Q. *Plukenetia huayllabambana* fruits: Analysis of bioactive compounds, antibacterial activity and relative action mechanisms. *Plants* **2020**, *9*, 1–14, doi:10.3390/plants9091111.
371. Yang, S.K.; Yusoff, K.; Thomas, W.; Akseer, R.; Alhosani, M.S.; Abushelaibi, A.; Lim, S.H.E.; Lai, K.S. Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–14, doi:10.1038/s41598-019-55601-0.
372. El-Baky, R.M.A.; Sandle, T.; John, J.; Abuo-Rahma, G.E.D.A.; Hetta, H.F. A novel mechanism of action of ketoconazole: Inhibition of the *NorA* efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 1703–1718, doi:10.2147/IDR.S201124.
373. Barksdale, S.M.; Hrifko, E.J.; van Hoek, M.L. Cathelicidin antimicrobial peptide from *Alligator mississippiensis* has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Dev. Comp. Immunol.* **2017**, *70*, 135–144, doi:10.1016/j.dci.2017.01.011.
374. Magesh, H.; Kumar, A.; Alam, A.; Priyam; Sekar, U.; Sumantran, V.N.; Vaidyanathan, R. Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J. Exp. Biol.* **2013**, *51*, 764–772.
375. Wille, J.J.; Kydonieus, A. Palmitoleic acid isomer (C16:1Δ6) in human skin sebum is effective

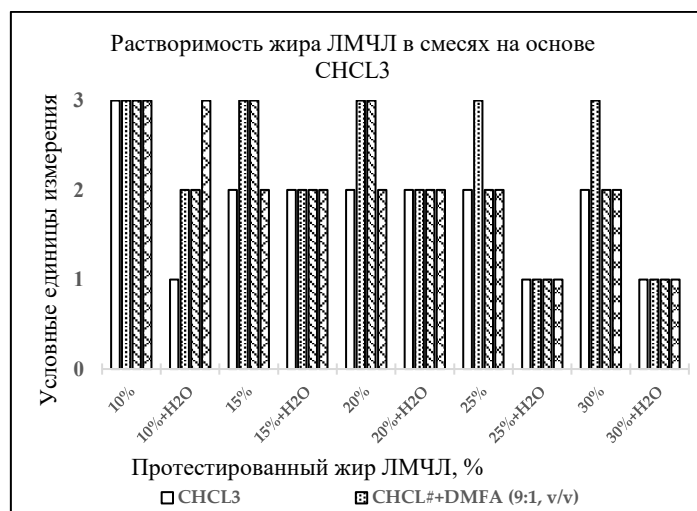
- against gram-positive bacteria. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2003**, *16*, 176–187, doi:10.1159/000069757.
376. Kim, N.; Son, J.H.; Kim, K.; Kim, H.J.; Shin, M.; Lee, J.C. DKsA modulates antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1–8, doi:10.3390/antibiotics10121472.
377. Rajendran, M.P.; Pallaiyan, B.B.; Selvaraj, N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant profile of essential oil from *Murraya koenigii* (L.) leaves. *Avicenna J. phytomedicine* **2014**, *4*, 200–14.
378. Harlystiarini, H.; Mutia, R.; Wibawan, I.W.T.; Astuti, D.A. In vitro antibacterial activity of black soldier fly (*Hermetia Illucens*) larva extracts against gram-negative bacteria. *Bul. Peternak.* **2019**, *43*, 125–129, doi:10.21059/buletinpeternak.v43i2.42833.
379. Auza, F.A.; Purwanti, S.; Syamsu, J.A.; Natsir, A. Antibacterial activities of black soldier flies (*Hermetia illucens. L*) extract towards the growth of *Salmonella typhimurium*, *E.coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2020**, *492*, 1–7, doi:10.1088/1755-1315/492/1/012024.
380. Park, S.I.; Chang, B.S.; Yoe, S.M. Detection of antimicrobial substances from larvae of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: *Stratiomyidae*). *Entomol. Res.* **2014**, *44*, 58–64, doi:10.1111/1748-5967.12050.
381. Umerska, A.; Cassisa, V.; Matougui, N.; Joly-Guillou, M.L.; Eveillard, M.; Saulnier, P. Antibacterial action of lipid nanocapsules containing fatty acids or monoglycerides as co-surfactants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *108*, 100–110, doi:10.1016/j.ejpb.2016.09.001.
382. Parsons, J.B.; Yao, J.; Frank, M.W.; Jackson, P.; Rock, C.O. Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Saphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 5294–5304, doi:10.1128/JB.00743-12.
383. Guarino, F.; Castiglione, S.; Terzaghi, M.; Krishnamoorthy, R.; Choudhury, A.R.; Walitang, D.I.; Anandham, R.; Senthilkumar, M.; Sa, T. Salt stress tolerance-promoting proteins and metabolites under plant-bacteria-salt stress tripartite interactions. *Appl. Sci.* **2022**, *Vol. 12*, Page 3126 **2022**, *12*, 1–14, doi:10.3390/APP12063126.
384. Hariharan, P.; Paul-Satyaseela, M.; Gnanamani, A. In vitro profiling of antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of thymoquinone against selected type and clinical strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **2016**, *62*, 283–289, doi:10.1111/lam.12544.

385. Chusri, S.; Voravuthikunchai, S.P. Damage of Staphylococcal cytoplasmic membrane by *Quercus infectoria* G. Olivier and its components. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *52*, 565–572, doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03041.x.
386. Fei, P.; Xu, Y.; Zhao, S.; Gong, S.; Guo, L. Olive oil polyphenol extract inhibits vegetative cells of *Bacillus cereus* isolated from raw milk. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 3894–3902, doi:10.3168/jds.2018-15184.
387. Shi, C.; Song, K.; Zhang, X.; Sun, Y.; Sui, Y.; Chen, Y.; Jia, Z.; Sun, H.; Sun, Z.; Xia, X.X. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0159006.
388. Wu, S.C.; Yang, Z.Q.; Liu, F.; Peng, W.J.; Qu, S.Q.; Li, Q.; Song, X. Bin; Zhu, K.; Shen, J.Z. Antibacterial effect and mode of action of flavonoids from licorice against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–14, doi:10.3389/fmicb.2019.02489.
389. Schäfer, A.B.; Wenzel, M. A how-to guide for mode of action analysis of antimicrobial peptides. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 1–27, doi:10.3389/fcimb.2020.540898.
390. Müller, D.J.; Dufrière, Y.F. Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 461–469, doi:10.1016/j.tcb.2011.04.008.
391. Nasompag, S.; Siritongsuk, P.; Thammawithan, S.; Srichaiyapol, O.; Prangkio, P.; Camesano, T.A.; Sinthuvanich, C.; Patramanon, R. AFM study of nanoscale membrane perturbation induced by antimicrobial lipopeptide C14 kyr. *Membranes (Basel)*. **2021**, *11*, 1–16, doi:10.3390/membranes11070495.

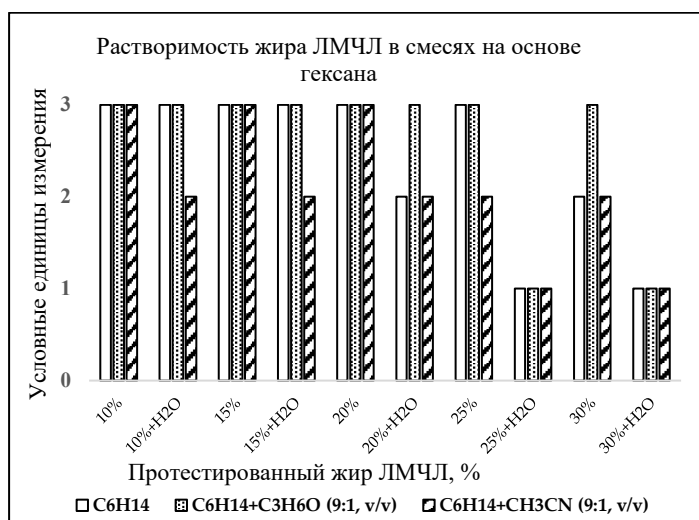
Приложение



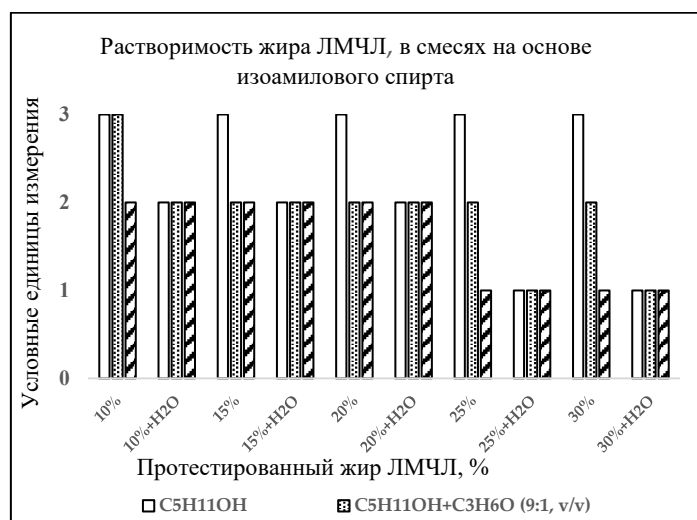
а)



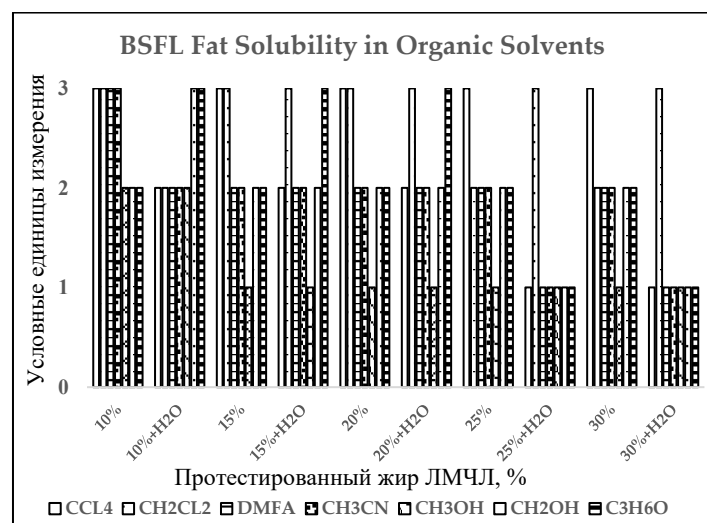
б)



в)



г)



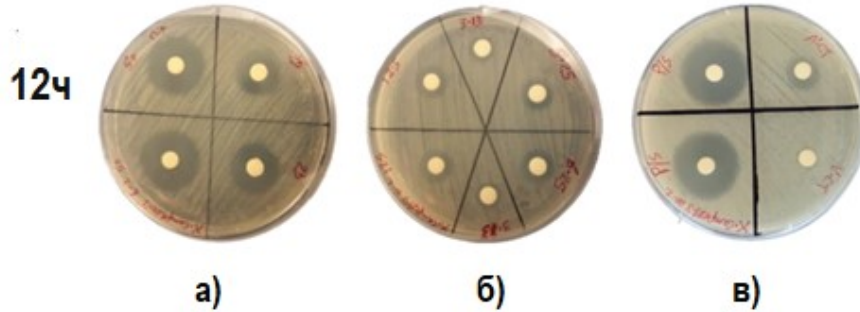
д)

Рисунок S1. Оценка растворимости жира ЛМЧЛ. Жир ЛМЧЛ, солюбилизированный в различных отдельных органических растворителях или их комбинации. Для повышения

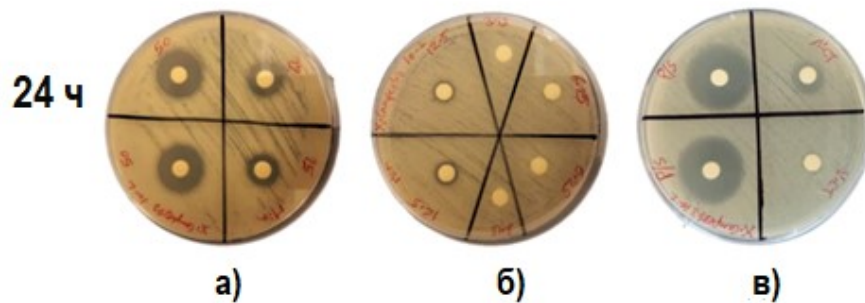
гидрофильности органические реагенты разбавляют в 10 раз H_2O . Растворимость жира ЛМЧЛ проверена в диапазоне концентрации 10-30%. Метки растворимости: 3 единицы - растворимый; 2 единицы - частично растворимый; 1 единица - нерастворимый.

Время

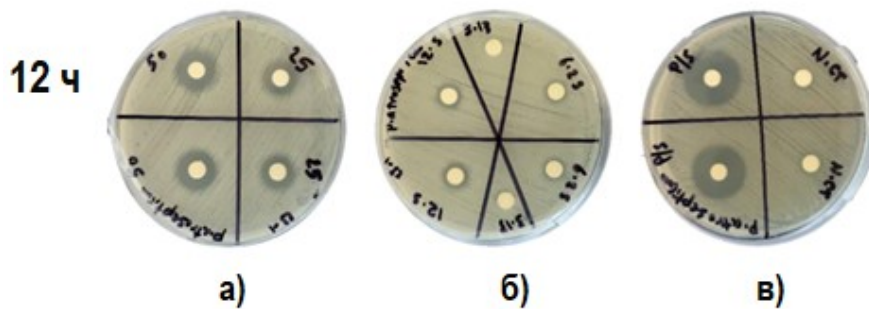
Xanthomonas campestris pv. *campestris* ATCC 13951



Xanthomonas campestris pv. *campestris* ATCC 13951



Pectobacterium atrosepticum ATCC BAA-672D



Pectobacterium atrosepticum ATCC BAA-672D

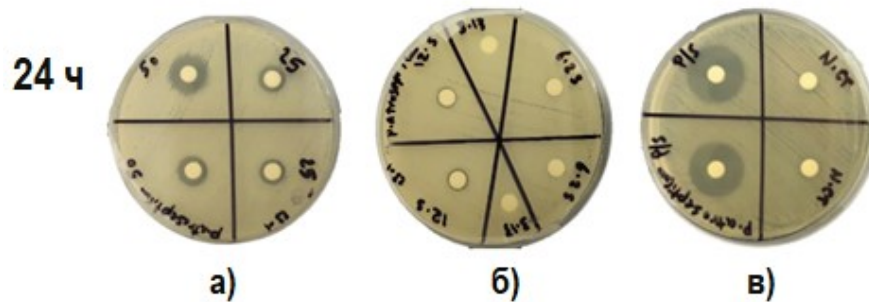


Рисунок S2. Анализ дисковой диффузии. Репрезентативные изображения зон ингибирования роста бактерий были измерены после 12 ч и 24 ч ночной инкубации дисков, загруженных на агар

чашек Петри с бактериями *Xanthomonas campestris* pv *campestris* ATCC 13951 и *Pectobacterium atrosepticum* ATCC ВАА-672D. Диски с тестируемыми образцами загружали 50 мкл КВМЭ из жира личинок с концентрациями 50 и 25 мг/мл (а); 12,5, 6,25 и 3,13 мг/мл (б); 50 мкл образцов П/С с концентрацией 5000 Ед/мл–5000 мкг/мл было используется в качестве положительного контроля (в). 50 мкл чистого экстрагирующего раствора КВМ использовали в качестве отрицательного контроля (ОК) (в). Все образцы были загружены в дубликатах.

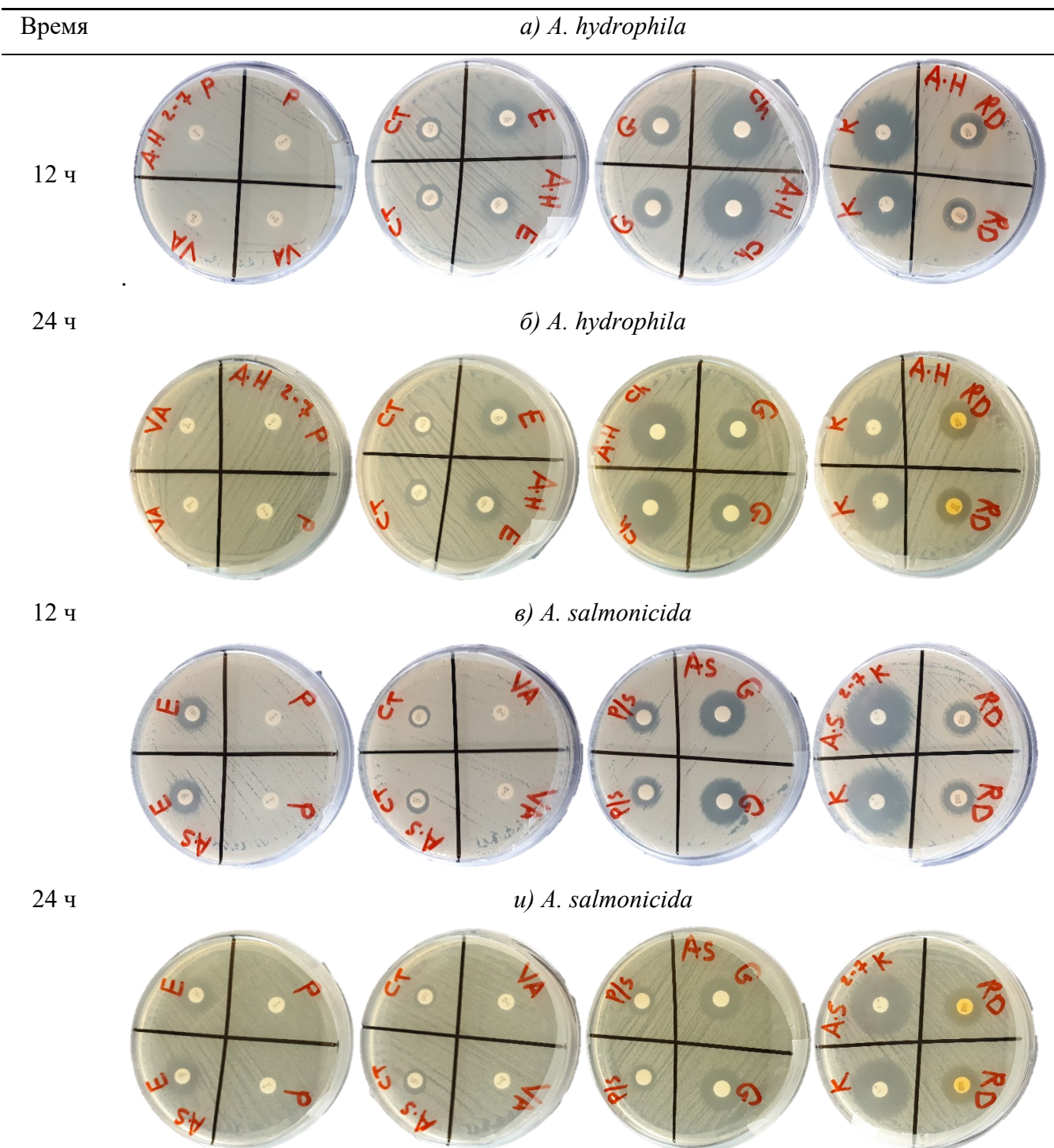


Рисунок S3. Структура резистентности *Aeromonas* spp к различным классам антимикробных агентов. Семь групп антибиотиков были протестированы против бактериальных штаммов рыб

методом дискового анализа. Все антибактериальные препараты вносили в чашки с агаром Мюллера Хинтона, культивируемые штаммами бактерий при плотности 10^8 (КОЕ/мл), и помещали с легким нажатием на поверхность агара чашек Петри. Все диски были выполнены в двух экземплярах, и результаты представляли собой среднее значение ДЗИ \pm SD трех независимых экспериментов.

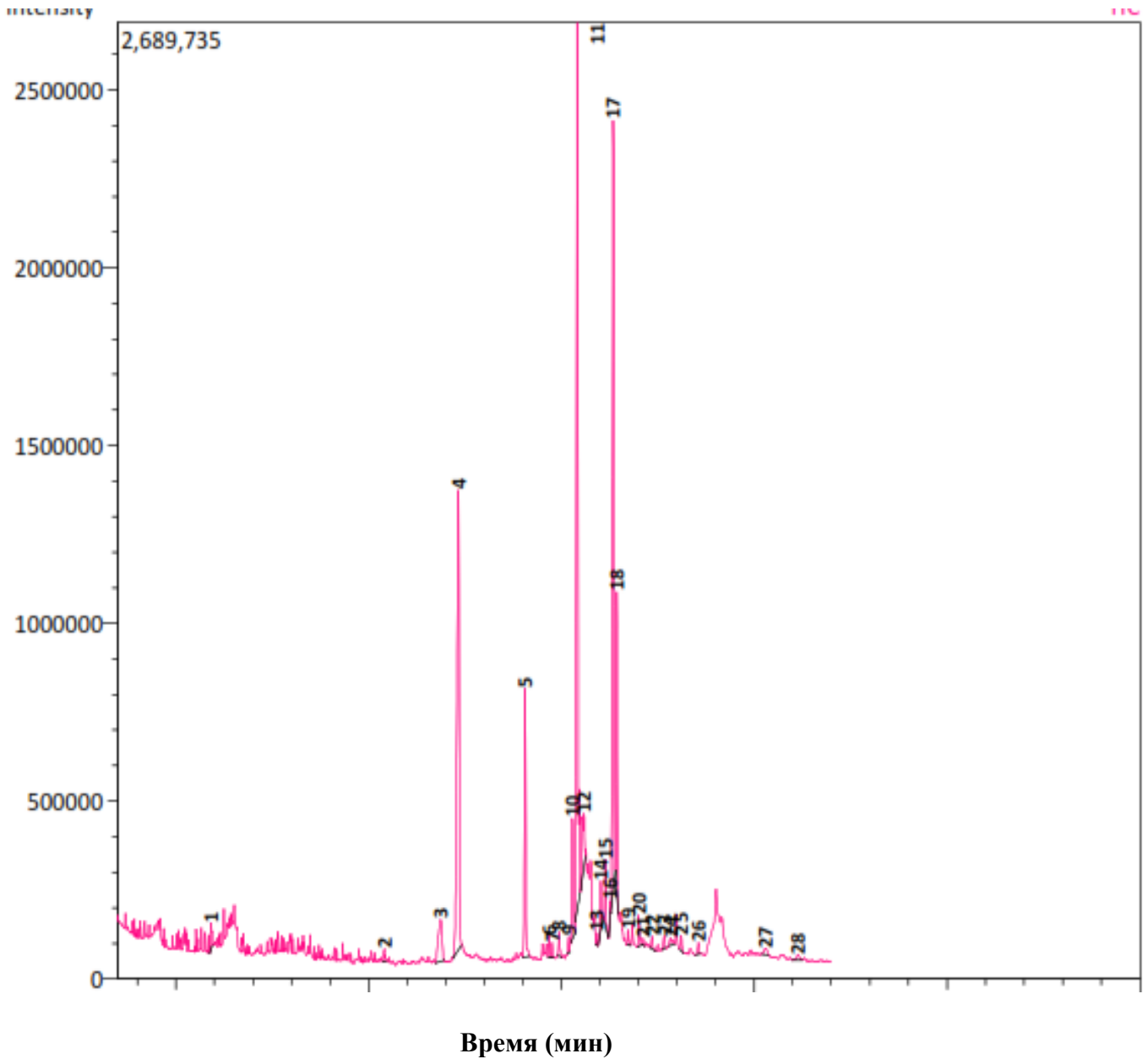


Рисунок S4. ГХ-МС хроматограмма КВМЭ1 из жира ЛМЧЛ. Профиль химического состава 28 соединений был идентифицирован с использованием библиотеки NIST-08.

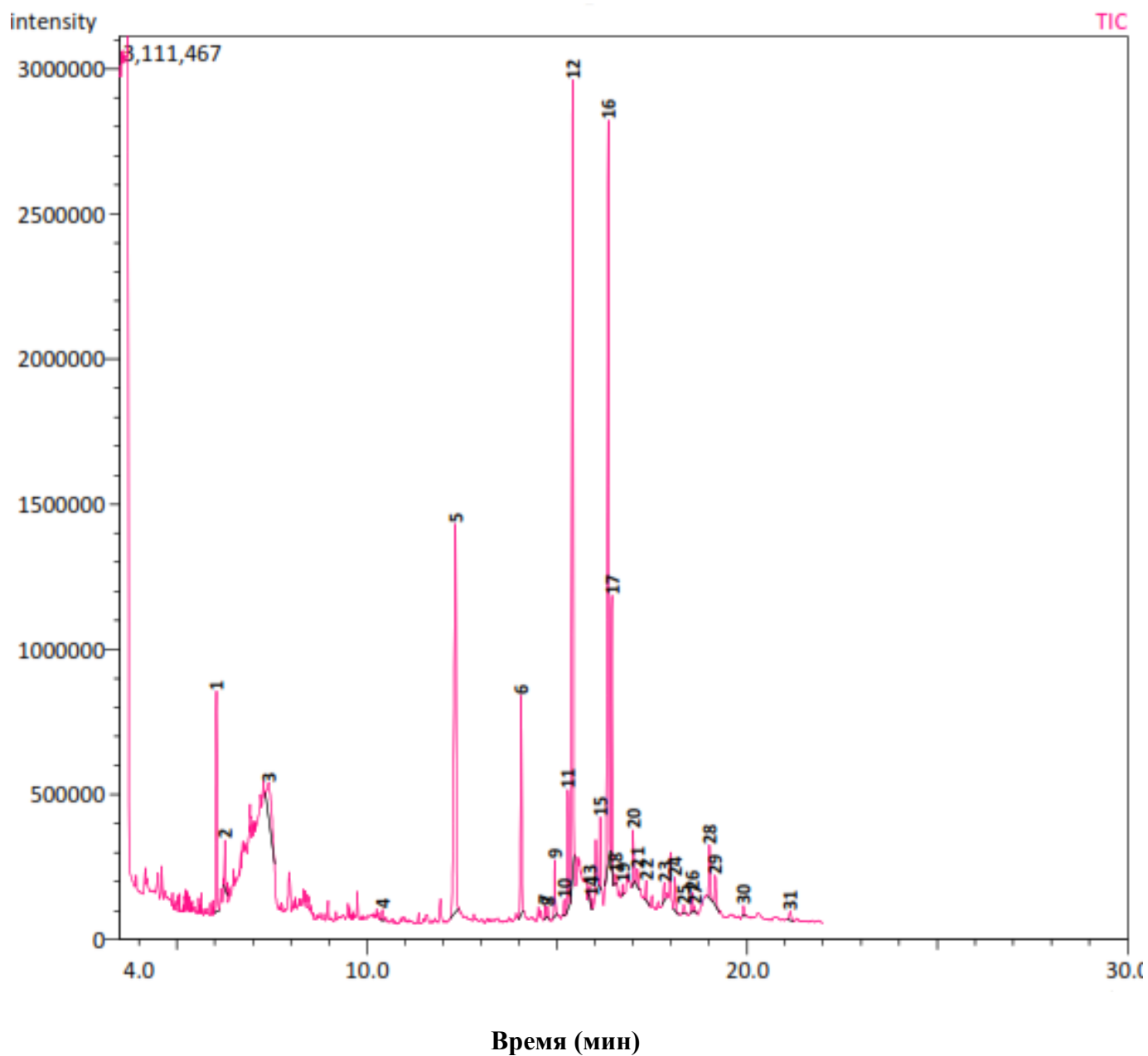


Рисунок S5. ГХ-МС хроматограмма КВМЭ2 из жира ЛМЧЛ. Профиль химического состава 31 соединения был идентифицирован с использованием библиотеки NIST-08.

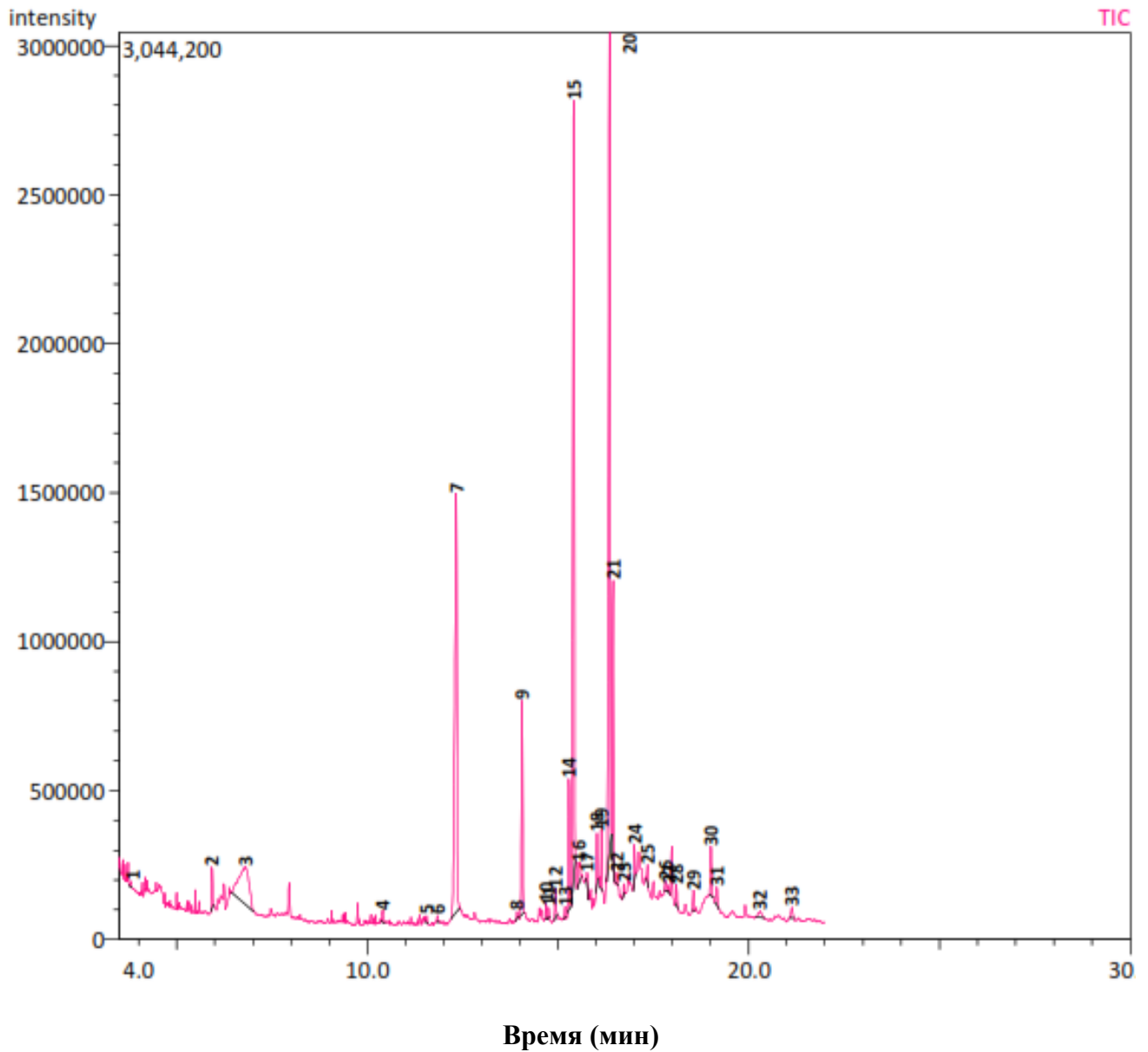
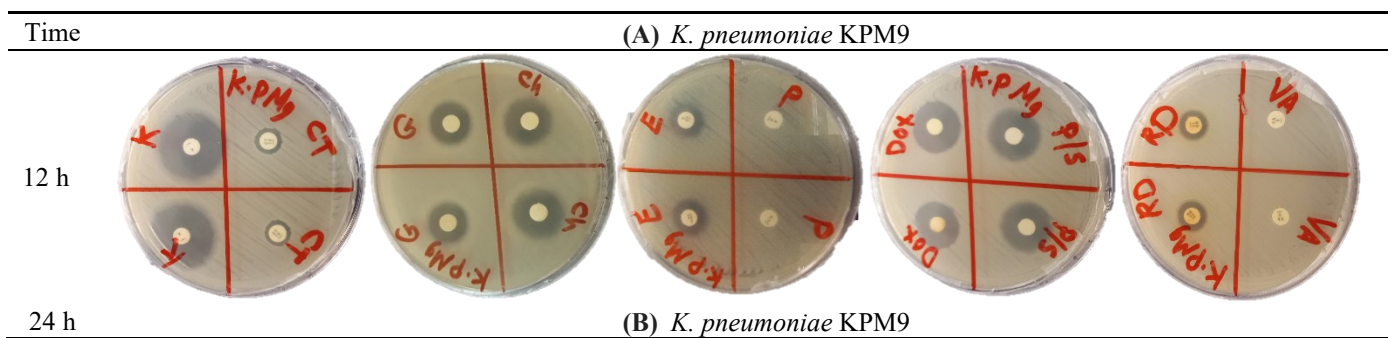


Рисунок S6. ГХ-МС хроматограмма КВМЭЗ из жира ЛМЧЛ. Профиль химического состава 33 соединения был идентифицирован с использованием библиотеки NIST-08.



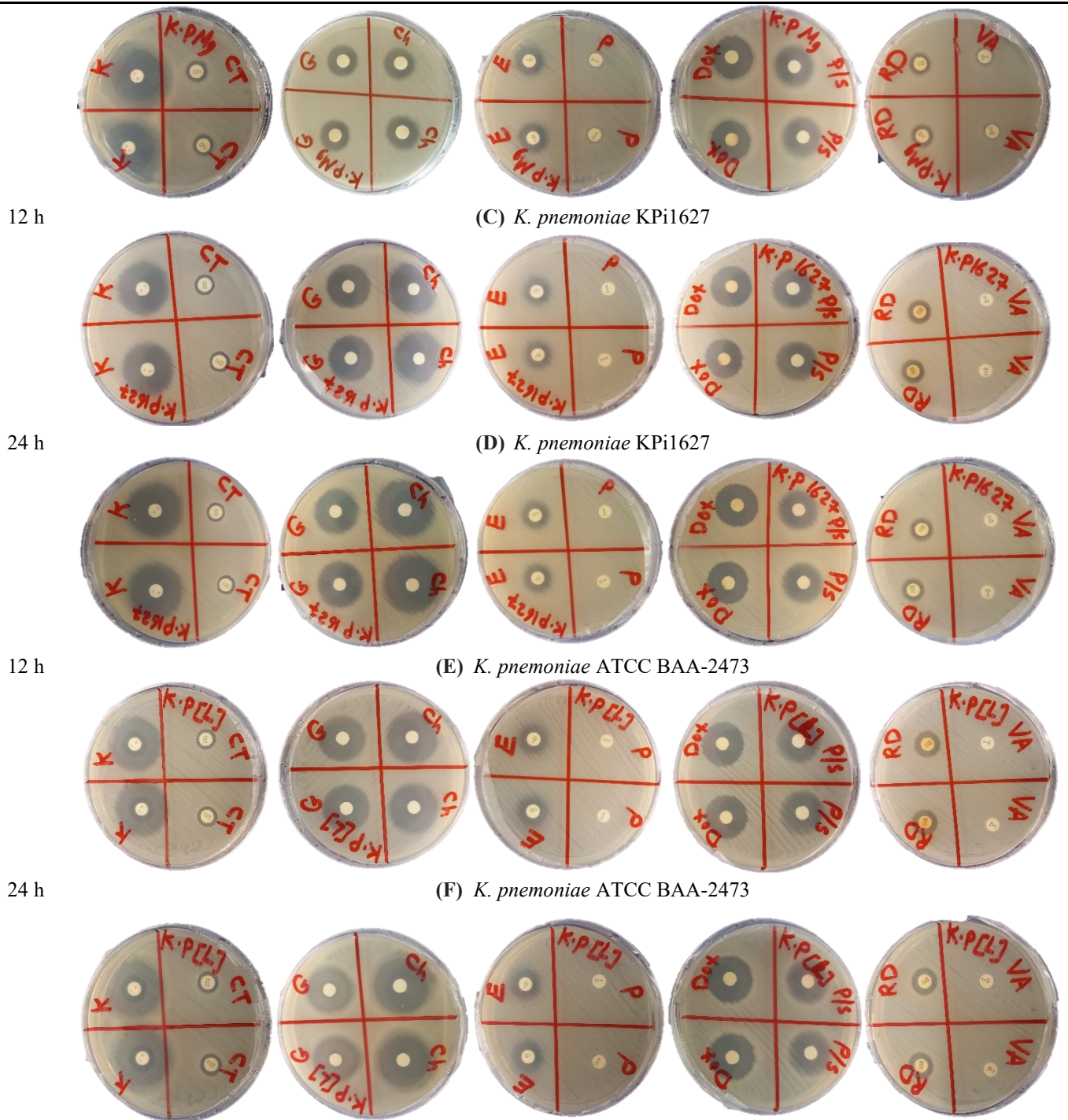


Figure S7. Susceptibility of (A, B) *K. pneumoniae* KPM9, (C, D) *K. pneumoniae* KPi1627 and (E, F) *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 against eight groups of antibiotics determined by disk diffusion assay. All antibiotics were applied to the discs and gently pressed on the surface of the Muller Hinton agar Petri dishes with cultured bacteria strains at density 10^8 (CFU/mL). All discs were placed in duplicates, and the mean of resulting IZD \pm SD of three independent experiments was estimated.

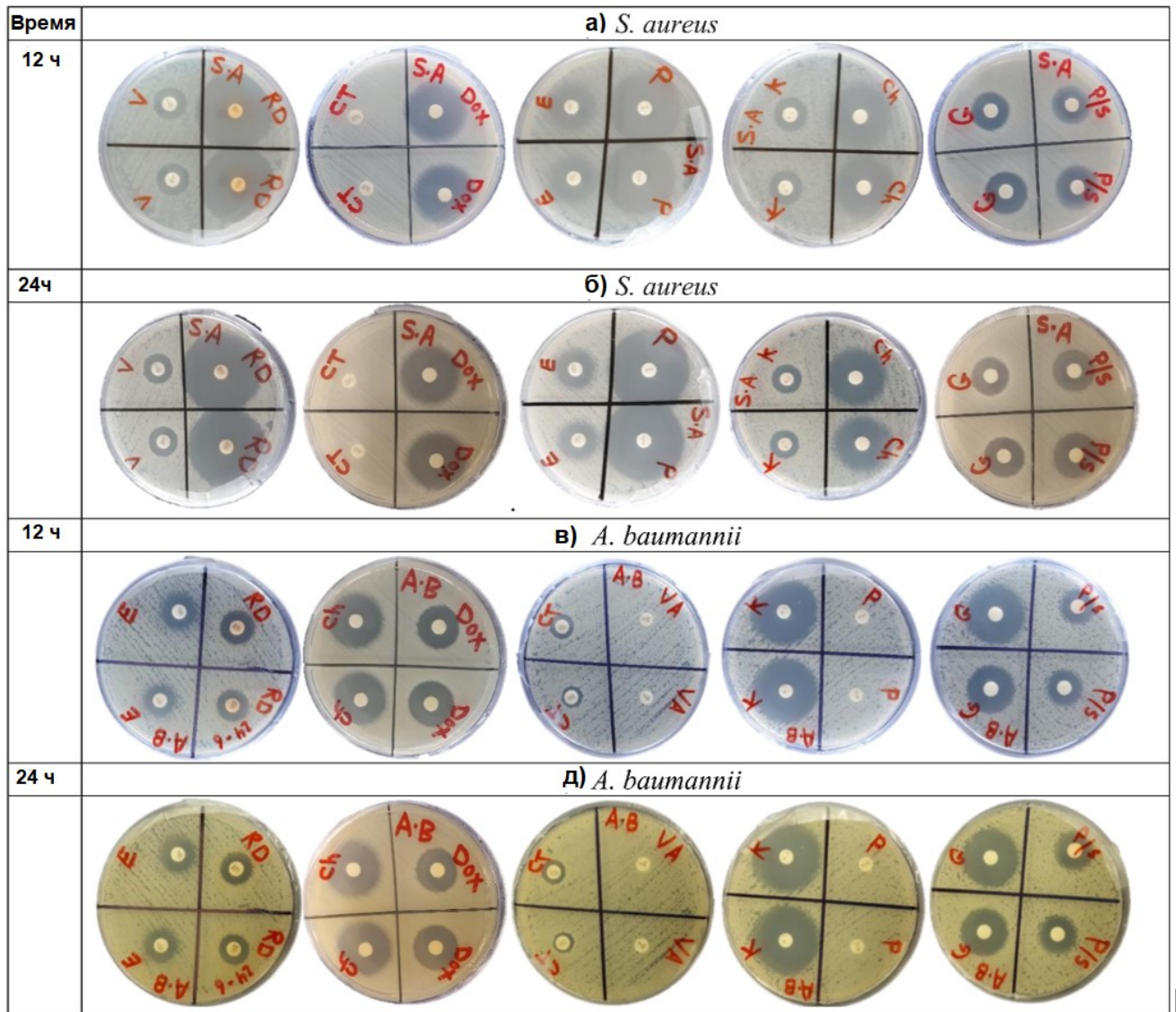


Рисунок S8. Чувствительность *S. aureus* ATCC 55804 и *A. baumannii* ATCC 19606, восьми групп антибиотиков, определяемых методом дисковой диффузии. Все антибиотики наносили на диски и осторожно надавливали на поверхность чашек Петри с агаром Мюллера Хинтона с культивируемыми штаммами бактерий при плотности 10^8 (КОЕ/мл). Все диски были помещены в дубликаты, и было оценено среднее значение результирующего ДЗИ \pm SD трех независимых экспериментов.

Таблица S1. Химический состав ГХ-МС анализа для КВМЭ1 жира ЛМЧЛ.

Пиковое число	Время хранения	Содержание (%)	Составное Имя (Библиотека NIST)	Химическая формула	Молекулярная масса (г/моль)	Сходство (%)
1	5,918	0,62	1,2-Пропандиол, 3-хлор-	$C_3H_7ClO_2$	110	82
2	10,405	0,31	Декановая кислота (каприновая кислота)	$C_{10}H_{20}O_2$	172	89
3	11,866	3,18	Бета.-D-Глюкопираноза, 1,6-ангидро-	$C_6H_{10}O_5$	162	92

4	12,33	19,32	Додекановая кислота (лауриновая кислота)	$C_{12}H_{24}O_2$	200	97
5	14,058	6,62	Тетрадекановая кислота (миристиновая кислота)	$C_{14}H_{28}O_2$	228	97
6	14,683	0,42	Додекановая кислота, этиловый эфир	$C_{14}H_{26}O_2$	226	79
7	14,756	0,3	Пентадекановая кислота	$C_{15}H_{30}O_2$	242	86
8	14,937	0,57	Октановая кислота, 2- диметиламиноэтиловый эфир	$C_{12}H_{25}NO_2$	215	89
9	15,188	0,3	Метилловый эфир гексадекановой кислоты (метилловый эфир пальмитиновой кислоты)	$C_{17}H_{34}O_2$	270	89
10	15,286	3,03	цис-9-Гексадеценная кислота	$C_{16}H_{30}O_2$	254	96
11	15,412	26,19	n-Гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота)	$C_{16}H_{32}O_2$	256	96
12	15,585	3,08	Додеканоилхлорид (хлорид лауриновой кислоты)	$C_{12}H_{23}ClO$	218	75
13	15,917	0,19	Тридекановая кислота	$C_{14}H_{28}O_2$	228	83
14	16,02	1,36	Додекановая кислота, 2,3- дигидроксипропиловый эфир (альфа-монолаурат глицерина)	$C_{15}H_{30}O_4$	274	82
15	16,139	1,35	9-Октадеценная кислота (Z)-, метилловый эфир (метилолеат)	$C_{19}H_{36}O_2$	296	89
16	16,258	0,37	Октадеценная кислота, метилловый эфир (метилловый эфир стеариновой кислоты)	$C_{19}H_{38}O_2$	298	86
17	16,345	22,65	Октадек-9-енная кислота (олеиновая кислота)	$C_{18}H_{34}O_2$	282	95
18	16,435	5,93	Октадекановая кислота (стеариновая кислота)	$C_{18}H_{36}O_2$	284	93
19	16,724	0,37	9,12-Октадекадиенная кислота (Z, Z)- (Линолевая кислота)	$C_{18}H_{32}O_2$	280	91
20	17,003	0,82	Ундеканал, 2-метил- Тетрадекановая кислота, 2- гидрокси-1-	$C_{12}H_{24}O$	184	82
21	17,115	0,16	(гидроксиметил)этиловый эфир (бета-моноголицерид миристиновой кислоты)	$C_{17}H_{34}O_4$	302	75

22	17,347	0,34	Эйкозановая кислота (арахидиновая кислота)	$C_{20}H_{40}O_2$	312	88
23	17,663	0,32	Олеоилхлорид (хлорид олеиновой кислоты)	$C_{18}H_{33}ClO$	300	87
24	17,824	0,35	Этанамин, 2,2'-оксибис [N, N- диметил- Гексадекановая кислота, 2- гидрокси-1-	$C_8H_{20}N_2O$	160	80
25	18,103	0,4	(гидроксиметил)этиловый эфир (бета-моноглицерид пальмитиновой кислоты)	$C_{19}H_{38}O_4$	330	92
26	18,551	0,32	Октадеканамид	$C_{18}H_{37}NO$	283	83
27	20,299	0,39	Додекановая кислота, 1- (гидроксиметил)-1,2- этандиловый эфир	$C_{27}H_{52}O_5$	456	72
28	21,134	0,34	Холеста-3,5-диен	$C_{27}H_{44}$	368	75

Таблица S2. Химический состав ГХ-МС анализа для КВМЭ2 жира ЛМЧЛ.

Пиковое число	Время хранения	Содержание (%)	Составное Имя (Библиотека NIST)	Химическая формула	Молекулярная масса (г/моль)	Сходство (%)
1	6,04	5,26	1,2-Пропандиол, 3-хлор-	$C_3H_7ClO_2$	110	97
2	6,27	1,18	2-Хлор-1,3-пропандиол	$C_3H_7ClO_2$	110	77
3	7,42	3,47	1,2,3-пропантриол (глицерол)	$C_3H_8O_3$	92	95
4	10,405	0,26	n-декановая кислота (Каприновая кислота)	$C_{10}H_{20}O_2$	172	86
5	12,33	16,68	Додекановая кислота (Лауриновая кислота)	$C_{10}H_{20}O_2$	200	97
6	14,058	5,56	Тетрадекановая кислота (Миристиновая кислота)	$C_{14}H_{28}O_2$	228	97
7	14,684	0,25	Додекановая кислота, этиловый эфир	$C_{14}H_{26}O_2$	226	77
8	14,755	0,2	Пентадекановая кислота	$C_{15}H_{30}O_2$	242	94
9	14,941	1,24	Октановая кислота, 2- диметиламиноэтиловый эфир	$C_{12}H_{25}NO_2$	215	92
10	15,188	0,32	Гексадекановая кислота, метилловый эфир (метилловый эфир пальмитиновой кислоты)	$C_{17}H_{34}O_2$	270	88
11	15,286	3,05	цис-9-Гексадеценная кислота	$C_{16}H_{30}O_2$	254	96

12	15,414	22,01	n-Гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота)	$C_{16}H_{32}O_2$	256	96
13	15,858	0,18	Додекановая кислота, 2- гидрокси-1-(гидроксиметил) этиловый эфир	$C_{15}H_{30}O_4$	274	75
14	15,918	0,18	Тридекановая кислота	$C_{13}H_{26}O_2$	214	87
15	16,137	1,36	Додекановая кислота, 2,3- дигидроксипропиловый эфир (альфа-монолаурат глицерина)	$C_{15}H_{30}O_4$	274	85
16	16,349	23,9	Октадек-9-еновая кислота (олеиновая кислота)	$C_{18}H_{34}O_2$	282	95
17	16,438	5,74	Октадекановая кислота (стеариновая кислота)	$C_{18}H_{36}O_2$	284	94
18	16,538	0,22	13-Тетрадека-11-ин-1-ол	$C_{14}H_{24}O$	208	77
19	16,724	0,21	9,12-Октадекадиеновая кислота (Z, Z)- (Линолевая кислота)	$C_{18}H_{32}O_2$	280	89
20	17,002	1,21	N1-Изопропил-2-метил-1,2- пропандиамин	$C_7H_{18}N_2$	130	83
21	17,114	0,51	Тетрадекановая кислота, 2- гидрокси-1- (гидроксиметил)этиловый эфир (бета-моноголицерид миристиновой кислоты)	$C_{17}H_{34}O_4$	302	78
22	17,344	0,46	Эйкозановая кислота (арахидиновая кислота)	$C_{20}H_{40}O_2$	312	91
23	17,822	0,49	Октановая кислота, 2- диметиламиноэтиловый эфир	$C_{12}H_{25}NO_2$	215	87
24	18,101	0,94	Гексадекановая кислота, 2- гидрокси-1- (гидроксиметил)этиловый эфир (бета-моноголицерид пальмитиновой кислоты)	$C_{19}H_{38}O_4$	330	95
25	18,336	0,26	9-Октадеценевая кислота (Z)-	$C_{18}H_{34}O_2$	282	88
26	18,55	0,48	Тетрадеканамид	$C_{14}H_{29}NO$	227	92
27	18,616	0,12	Тритриаконтан	$C_{33}H_{68}$	464	79
28	19,009	1,68	Олеоилхлорид	$C_{18}H_{33}ClO$	300	93
29	19,162	1,09	9-Октадеценевая кислота, 1,2,3- пропантрииловый эфир, (E, E, E)-	$C_{57}H_{104}O_6$	884	91
30	19,906	0,27	Октадеканамид	$C_{18}H_{37}NO$	283	91
31	21,137	0,35	Холеста-3,5-диен	$C_{27}H_{44}$	368	80

Таблица S3. Химический состав ГХ-МС анализа для КВМЭЗ жира ЛМЧЛ.

Пиковое число	Время хранения	Содержание (%)	Составное Имя (Библиотека NIST)	Химическая формула	Молекулярная масса (г/моль)	Сходство (%)
1	3,798	0,11	2-Пропанон, 1-гидрокси-	$C_3H_6O_2$	74	83
2	5,928	0,85	1,2-Пропандиол, 3-хлор- (глицерин. альфа.- хлоргидрин)	$C_3H_7ClO_2$	110	94
3	6,808	7,87	1,2,3-пропантриол (глицерин)	$C_3H_8O_3$	92	96
4	10,403	0,3	n-Декановая кислота (каприновая кислота)	$C_{10}H_{20}O_2$	172	84
5	11,552	0,11	бензол, октил-	$C_{14}H_{22}$	190	82
6	11,84	0,14	Бета.-D-Глюкопираноза, 1,6- ангидро- (Левоглюкозан)	$C_6H_{10}O_5$	162	77
7	12,331	17,66	Додекановая кислота (лауриновая кислота)	$C_{12}H_{24}O_2$	200	97
8	13,923	0,13	2,4-Додекадиенал, (E, E)-	$C_{12}H_{20}O$	180	80
9	14,058	5,27	Тетрадекановая кислота (миристиновая кислота)	$C_{14}H_{28}O_2$	228	97
10	14,683	0,27	Додекановая кислота, этиловый эфир	$C_{14}H_{26}O_2$	226	77
11	14,753	0,2	Пентадекановая кислота	$C_{15}H_{30}O_2$	242	91
12	14,936	0,64	3-Циклопентилпропионовая кислота, 2- диметиламиноэтиловый эфир	$C_{12}H_{23}NO_2$	213	92
13	15,187	0,23	Гексадекановая кислота, метиловый эфир (метиловый эфир пальмитиновой кислоты)	$C_{17}H_{34}O_2$	270	88
14	15,286	3,15	цис-9-Гексадеценная кислота	$C_{16}H_{30}O_2$	254	96
15	15,413	21,76	n-Гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота)	$C_{16}H_{32}O_2$	256	96
16	15,55	0,97	Додеканоилхлорид (хлорид лауриновой кислоты)	$C_{12}H_{23}ClO$	218	75
17	15,761	0,21	Холест-5-ен-3-ол (3. бета.)-, карбонохлоридат (холестерин, хлороформат)	$C_{28}H_{45}ClO_2$	448	76
18	16,021	1,08	Додекановая кислота, 2- гидрокси-1- (гидроксиметил)этиловый	$C_{15}H_{30}O_4$	274	82

			эфир (бета-моногли лауриновой кислоты)			
			Оксиранундекановая кислота,			
19	16,137	1,14	3-пентил-, метиловый эфир, цис-	$C_{19}H_{36}O_3$	312	85
20	16,35	26,28	Октадек-9-еновая кислота (цис-олеиновая кислота)	$C_{18}H_{34}O_2$	282	95
21	16,439	5,82	Октадекановая кислота (стеариновая кислота)	$C_{18}H_{36}O_2$	284	94
22	16,542	0,25	9,12-Гексадекадиеновая кислота, метиловый эфир	$C_{17}H_{30}O_2$	266	78
23	16,723	0,21	9,12-Октадекадиеновая кислота (Z, Z)- (Линолевая кислота)	$C_{18}H_{32}O_2$	280	91
24	17,004	0,86	Ундеканал, 2-метил-	$C_{12}H_{24}O$	184	81
25	17,345	0,31	Эйкозановая кислота (арахидиновая кислота)	$C_{20}H_{40}O_2$	312	90
26	17,82	0,23	Октановая кислота, 2- диметиламиноэтиловый эфир	$C_{12}H_{25}NO_2$	215	82
27	17,901	0,13	цис-9-Гексадеценал	$C_{16}H_{30}O$	238	83
28	18,101	0,49	Гексадекановая кислота, 2- гидрокси-1- (гидроксиметил)этиловый эфир	$C_{19}H_{38}O_4$	330	95
29	18,55	0,46	Октадеканамид	$C_{18}H_{37}NO$	283	92
30	19,01	1,46	Олеoilхлорид (хлорид олеиновой кислоты)	$C_{18}H_{33}ClO$	300	92
31	19,163	0,61	9-Октадеценовая кислота, 1,2,3-пропантрииловый эфир, (E, E, E)-	$C_{57}H_{104}O_6$	884	89
32	20,3	0,44	Октадекановая кислота, 2,3- бис[(1-Оксотетрадецил) Окси] пропиловый эфир	$C_{49}H_{94}O_6$	778	77
33	21,136	0,36	Холеста-3,5-диен	$C_{27}H_{44}$	368	90