

SYNERGISM OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE MIXTURE OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMV AC-5017 SURFACTANTS WITH OTHER BIOCIDAL COMPOUNDS

T. Pirog, L. Kliuchka, I. Kliuchka, S. Antoniuk, O. Bakhtii, D. Zhaliuk
National University of Food Technologies

Key words:

Rhodococcus erythropolis
IMV Ac-5017
Surface-active substances
Antibiotics
Tea tree essential oil
Synergism of
antimicrobial action

Article history:

Received 10.09.2020
Received in revised form
23.09.2020
Accepted 07.10.2020

Corresponding author:

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

ABSTRACT

Increasing the resistance of pathogenic microorganisms, which are the causative agents of a wide range of infectious diseases of humans and animals, stimulates the search for a new, alternative to antibiotics, natural compounds. Such compounds are microbial surface-active substances (SAS), which have a wide range of biological properties (antimicrobial, anti-adhesive activity and the ability to biofilms destruction), as well as essential oils. However, the disadvantage of essential oils is insufficiently high antimicrobial activity (minimum inhibitory concentration is 500—1600 µg/ml).

The effect of a mixture of surfactants synthesized by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on biodiesel production waste and ent sunflower oil, antibiotics ciprofloxacin, ofloxacin and tea tree essential oil on bacteria (*Pseudomonas*. MI-2, *Escherichia coli* IEM-1, *Staphylococcus aureus* BMS-1) was investigated in the article

It was found that surfactants synthesized on industrial waste showed synergism of antimicrobial activity with the tested antibiotics and essential oil. The minimum inhibitory concentrations of the surfactant mixture with antibiotics against bacterial test-cultures were 0.8—25.5 µg/ml and were significantly lower than each compound alone (500—25000 and 3.2—102.5 µg/ml for antibiotics and surfactants, respectively). The use of a mixture of surfactants and tea tree essential oil made it possible to reduce the minimum inhibitory concentrations of essential oil against the tested cultures from 156—625 to 2.4—19.5 µg/ml.

СИНЕРГІЗМ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ СУМІШІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ІМВ АС-5017 З ІНШИМИ БІОЦИДНИМИ СПОЛУКАМИ

Т. П. Пирог, Л. В. Ключка, І. В. Ключка,
С. І. Антонюк, О. Л. Бахтій, Д. В. Жалюк
Національний університет харчових технологій

Підвищення стійкості патогенних мікроорганізмів, які є збудниками широкого спектра інфекційних захворювань у людини й тварин, стимулює пошук нових, альтернативних антибіотикам, природних сполук. Такими сполуками є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), яким притаманний широкий спектр біологічних властивостей (антимікробна, антиадгезивна активність і здатність до руйнування біоплівки), а також ефірні олії. Проте недоліком ефірних олій є недостатньо висока антимікробна активність (мінімальні інгібуючі концентрації становлять 500—1600 мкг/мл).

*У статті досліджено дію на бактерії (*Pseudomonas*. МІ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1) суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ІМВ АС-5017 на відходах виробництва біодизелю і відпрацьованій соняшниковій олії з антибіотиками ципрофлоксацином, офлоксацином та ефірною олією чайного дерева.*

Встановлено, що ПАР, синтезовані на промислових відходах, проявляли синергічну антимікробну активність з досліджуваними антибіотиками й ефірною олією. Мінімальні інгібуючі концентрації суміші ПАР з антибіотиками щодо бактеріальних тест-культур становили 0,8—25,5 мкг/мл і були значно нижчими, ніж кожної сполуки окремо (500—25000 і 3,2—102,5 мкг/мл для антибіотиків та ПАР відповідно). Використання суміші поверхнево-активних речовин та ефірної олії чайного дерева дало змогу знизити мінімальні інгібуючі концентрації ефірної олії щодо досліджуваних тест-культур з 156—625 до 2,4—19,5 мкг/мл.

Ключові слова: *Rhodococcus erythropolis* ІМВ АС-5017, поверхнево-активні речовини, антибіотики, ефірна олія чайного дерева, синергізм антимікробної дії.

Постановка проблеми. Нині антибіотикотерапія залишається основним методом лікування широкого спектра інфекційних захворювань у людини й тварин. Однак її ефективність стрімко знижується на тлі швидкого поширення резистентних форм мікроорганізмів [1]. Ще у 2016 р. Всесвітня організація охорони здоров'я опублікувала перелік пріоритетних напрямків підвищення ефективності використання антибіотиків, серед яких можливість їх використання у комбінації з іншими природними сполуками [2]. Серед таких речовин природного походження найперспективнішими залишаються ефірні олії, які завдяки наявності у їхньому складі великої кількості терпенів та ароматичних сполук характеризуються антибактеріальною й антифунгальною активністю [3]. Зазначимо проте, що використання ефірних олій як антимікробних монопрепаратів обмежується високими значеннями їхніх мінімальних інгібуючих концентрацій (500—1600 мкг/мл)

щодо більшості бактеріальних і дріжджових тест-культур [4]. Окрім ефірних олій, перспективними природними сполуками, які можуть бути використані у комбінації з антибіотиками, є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР). Однак, незважаючи на широкий спектр біологічних властивостей (антимікробна, антиадгезивна активність, здатність до руйнування біоплівки) цих продуктів мікробного синтезу, відомості про їх використання в комплексі з іншими біоцидами є обмеженими [5].

Раніше було встановлено можливість синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на гідрофільних (глюкоза, етанол) і гідрофобних (рідкі парафіни, гексадекан) субстратах [6; 7]. Пізніше [8] було показано, що ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 притаманна антимікробна й антиадгезивна активність.

Мета статті: дослідити антимікробну активність суміші поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 з антибіотиками та ефірною олією чайного дерева.

Матеріали і методи. Об'єкт досліджень — штам *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України.

Як тест-культури для визначення антимікробної активності використовували штами бактерій *Pseudomonas* МІ-2, *Escherichia coli* IEM-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1 з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Використовували антибіотики ципрофлоксацин та офлоксацин — антибактеріальні препарати з групи фторхінолонів II покоління, ефірну олію чайного дерева (виробник ТОВ «Ароматика», Україна).

R. erythropolis IMB Ac-5017 культивували у рідкому поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 1,3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, NaCl — 1,0, Na_2HPO_4 — 0,6, KH_2PO_4 — 0,14, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001. Як джерело вуглецю використовували відходи виробництва біодизелю та відпрацьовану соняшникову олію (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's, Київ) у концентрації 6 та 2% (об'ємна частка) відповідно.

Як посівний матеріал використовували культуру із середини експоненційної фази росту, вирощену в середовищі наведеного вище складу, що містило 0,5% відповідного субстрату. Кількість інокуляту з титром 10^4 — 10^5 клітин/мл становила 5% від об'єму середовища.

Культивування здійснювали у 750 мл колбах зі 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 120 год.

Кількість позаклітинних ПАР визначали, використовуючи модифікований метод Блай і Даєра [9] після екстракції їх сумішню хлороформу та метанолу (2:1) з супернатанту культуральної рідини. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g протягом 20 хв.

Антимікробну дію антибіотиків, ефірної олії, поверхнево-активних речовин та їх суміші аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ). У стерильних умовах у 10 пробірок вносили

по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл антимікробної речовини (антибіотики, ПАР, ефірна олія) певної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили в наступну пробірку. Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Кінцевий об'єм у кожній пробірці становив 1 мл, а концентрація антибіотиків, ПАР або ефірної олії у кожній наступній пробірці знижувалася вдвічі. Як контроль використовували 1 мл МПБ без додавання розчину антимікробних речовин. Далі в кожну з пробірок вносили по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^5 — 10^6 КУО/мл) та перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 24—26°C. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) — пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) — помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію антибіотиків, ПАР, ефірної олії та їх суміші визначали як значення концентрації досліджуваних речовин у першій пробірці, де ріст був відсутній.

Для оцінки синергічної дії ПАР з антибіотиками та ефірною олією використовували показник фракційної інгібуючої концентрації (ФІК) — сума відношення концентрації кожної речовини в суміші до їх мінімальної інгібуючої концентрації. Показник ФІК розраховували за формулою [10]:

$$\Sigma = \text{FIC} = (C_A / \text{MIC}_A) + (C_B / \text{MIC}_B),$$

де $C_{A,B}$ — концентрація антимікробної речовини в суміші; $\text{MIC}_{A,B}$ — мінімальна інгібуюча концентрація антимікробної речовини окремо.

Співвідношення препаратів у суміші становило 1:1, при цьому концентрація ПАР залишалася незмінною, а концентрацію антибіотика/ефірної олії знижували методом послідовних двократних розведень, в іншому варіанті концентрація антибіотика/ефірної олії залишалася незмінною, а концентрацію ПАР знижували як описано вище.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3—5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали як описано у [6—8]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. Відомо, що організація промислового виробництва мікробних ПАР обмежується насамперед високою собівартістю цільового продукту. Одним із підходів до здешевлення таких технологій є використання як субстратів промислових відходів, таких як технічний гліцерин (побічний продукт виробництва біодизелю) і пересмажена соняшникова олія (відхід харчової промисловості). Зазначимо, що відомі технології очищення біодизелю (реакції нейтралізації, відділення метанолу, іонна абсорбція, вакуумна дистиляція тощо) [11], є економічно не вигідними, а повторне використання пересмажених олій лімітується наявністю у їхньому складі токсичних альдегідів акролеїну й акриламід у [12]. Тому використання як субстратів для одержання мікробних ПАР таких побічних продуктів виробництва дасть змогу не лише знизити собівартість цільового продукту мікробного синтезу, а й вирішити ряд екологічних проблем, пов'язаних з нерегламентованими викидами промислових відходів у навколишнє середовище.

Що ж до вибору антибіотиків, то він був зумовлений тим, що, незважаючи на ефективність використання фторхінолонів як антимікробних засобів, у дослідженнях останніх років повідомляється про збільшення кількості резистентних, зокрема до ципрофлоксацину й офлоксацину, штамів *Escherichia coli* [13], *Pseudomonas aeruginosa* [14; 15], *Staphylococcus aureus* [16].

На першому етапі досліджували можливість прояву синергічної дії мікробних поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на промислових відходах, з антибіотиками ципрофлоксацином та офлоксацином (табл. 1 та 2).

Таблиця 1. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, ципрофлоксацину та їх суміші

Субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	МІК (мкг/мл)				ФІК, ФІК≤0,5 — синергізм
		ПАР	Ципрофлоксацину	Ципрофлоксацину у суміші з ПАР*	ПАР у суміші з ципрофлоксацином**	
Відходи виробництва біодизелю	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	3,2	500	7,8	0,8	0,26
	<i>Pseudomonas</i> . МІ-2	6,8	500	15,6	3,2	0,47
	<i>S. aureus</i> БМС-1	102,5	2000	15,6	25,6	0,25
Відпрацьована олія	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	3,4	500	125	1,7	0,75
	<i>Pseudomonas</i> . МІ-2	25,6	500	125	3,4	0,38
	<i>S. aureus</i> БМС-1	25,6	2000	500	1,7	0,31

Примітка: під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5%; табл. 1 та 2: * — концентрація антибіотика залишалася незмінною, а концентрацію ПАР зменшували методом послідовних двократних розведень, ** — концентрація ПАР залишалася незмінною, а концентрацію антибіотика знижували методом послідовних двократних розведень.

Таблиця 2. Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, офлоксацину та їх суміші

Субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	МІК (мкг/мл)				ФІК, ФІК≤0,5 — синергізм
		ПАР	Офлоксацину	Офлоксацину в суміші з ПАР*	ПАР у суміші з офлоксацином**	
Відходи виробництва біодизелю	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	3,2	12500	390	1,7	0,50
	<i>Pseudomonas</i> . МІ-2	6,8	12500	195	3,6	0,52
	<i>S. aureus</i> БМС-1	102,5	25000	780	25,5	0,24
Відпрацьована олія	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	3,4	12500	195	1,7	0,5
	<i>Pseudomonas</i> . МІ-2	25,6	12500	390	3,4	0,16
	<i>S. aureus</i> БМС-1	25,6	25000	390	3,4	0,16

Встановлено, що незалежно від природи використовуваного субстрату, поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 проявляли синергізм антимікробної дії з обома досліджуваними антибіотиками. Так, наприклад, МІК ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, щодо *E. coli* ІЕМ-1 та *Pseudomonas*. МІ-2, становили 3,2 та 6,8 мкг/мл, ципрофлоксацину — 500 мкг/мл, а їх суміші — 7,8 та 15,6 мкг/мл відповідно. Використання поверхнево-активних речовин, утворених на відпрацьованій соняшниковій олії, у комбінації з цим антибіотиком дали змогу знизити МІК останнього щодо *E. coli* ІЕМ-1, *Pseudomonas*. МІ-2 та *S. aureus* БМС-1 з 500 та 2000 мкг/мл до 1,7—3,4 та 1,7 мкг/мл відповідно (табл. 1).

Аналогічні закономірності спостерігали в разі використання суміші ПАР штаму ІМВ Ас-5071 та офлоксацину. У цьому разі значення МІК антибіотика щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур вдалося знизити у 8—16 разів (див. табл. 2).

Як видно з даних, наведених у табл. 1 і 2, показник фракційної інгібуючої концентрації не перевищував 0,5 (за винятком ФІК для суміші ПАР, синтезованих на відпрацьованій олії, з ципрофлоксацином щодо штаму ІЕМ-1), що вказує на синергізм антимікробної дії цих речовин.

У доступній літературі нам вдалося знайти інформацію про застосування ципрофлоксацину [17; 18] та офлоксацину [18; 19] у комбінації з ефірними оліями. Так, у [17] показано можливість використання ефірної олії ажгону для зниження мінімальної інгібуючої концентрації ципрофлоксацину. Так, внесення ефірної олії в концентрації 30 мкг/мл у суміш з антибіотиком (співвідношення 1:1) дало змогу знизити МІК останнього щодо *E. coli* АТСС 8739 з 3,6 до 0,6 мг/мл. При цьому значення ФІК становило 0,5, що вказує на синергізм антимікробної дії.

Дані, наведені у [18], підтверджують можливість використання метанольного екстракту, отриманого з насіння ажгону, у суміші з ципрофлоксацином для боротьби з резистентними до цього антибіотика штамми мікроорганізмів. Так, дослідниками було показано, що використання екстракту ажгону в концентрації 15,6—250 мкг/мл супроводжувалося зниженням МІК антибіотика щодо різних ципрофлоксацин-резистентних штамів *E. coli* з 4—128 до 0,125—8 мкг/мл.

Комбінація ефірної олії хлоранту японського (концентрація не наведена) з офлоксацином забезпечила зменшення МІК антибіотика щодо метицилін-резистентного штаму *S. aureus* 760 та *E. coli* з 260 до 4 мкг/мл та з 60 до 6 мкг/мл відповідно [19]. У [20] встановлено можливість використання як ефірної олії, так і метанольного екстракту, отриманого з насіння олії ятрофи, у суміші з офлоксацином. Так, використання екстракту й ефірної олії дає змогу зменшити мінімальну інгібуючу концентрацію антибіотика щодо *E. coli* (штам не наведено) та метицилін-резистентного штаму *S. aureus* 1 з 50 та 100 мкг/мл до 3,1 та 1,56 мкг/мл відповідно.

Зазначимо, що в [17—20] автори встановлювали мінімальні інгібуючі концентрації ефірних олій, проте не акцентували увагу на досить високих (від 600 до 1100 мкг/мл) їхніх значеннях, а також можливих підходах до зменшення ефективних концентрацій.

У попередніх дослідженнях ми встановили здатність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, проявляти синергічну антимікробну активність з антибіотиками [21], протигрибковими засобами [22] та ефірними оліями чайного дерева, кориці й лемонграсу [23]. У зв'язку з цим припустили, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *R. erythropolis* IMB Ac-5017, окрім синергізму антимікробної дії з антибіотиками, також проявлятимуть високий антимікробний ефект у комбінації з ефірними оліями. Подальші дослідження підтвердили це припущення (табл. 3). Експерименти показали, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на промислових відходах, проявляли синергізм антимікробної дії з ефірною олією чайного дерева.

Так, наприклад, використання суміші поверхнево-активних речовин, одержаних на відходах виробництва біодизелю, та ефірної олії дає змогу знизити МІК останньої щодо *E. coli* IEM-1 з 625 мкг/мл до 2,4 мкг/мл. При цьому значення фракційної інгібуючої концентрації не перевищувала 0,5, що вказує на їхній синергізм (табл. 3).

Таблиця 3. Синергізм антимікробної дії суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* IMB Ac-5017, та ефірної олії чайного дерева

Субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	МІК (мкг/мл)				ФІК, ФІК $\leq$ 0,5 — синергізм
		ПАР	ефірної олії	ПАР у суміші з ефірною олією *	ефірної олії в суміші з ПАР**	
Відходи виробництва біодизелю	<i>E. coli</i> IEM-1	3,2	625	0,8	2,4	0,25
	<i>Pseudomonas</i> MI-2	6,8	312	3,4	4,8	0,01
	<i>S. aureus</i> BMC-1	51,2	156	12,8	19,5	0,37
Відпрацьована олія	<i>E. coli</i> IEM-1	3,4	625	0,85	156	0,49
	<i>Pseudomonas</i> MI-2	440	312	3,4	4,8	0,02
	<i>S. aureus</i> BMC-1	25,6	156	6,4	9,75	0,31

У попередніх дослідженнях [24] було показано можливість використання суміші поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на етанолі, та ефірної олії чайного дерева, проте синергізм антимікробної дії визначали за ступенем виживання клітин у суспензійній культурі, що не дає нам змоги порівняти дані, наведені у табл. 3, з попередніми результатами.

Зазначимо, що з моменту публікації результатів наших досліджень [23] у літературі не з'явилася нова інформація щодо синергічної антимікробної дії комплексу мікробних ПАР та ефірних олій. Крім того, в огляді [25], опублікованому у 2019 р., ми підсумували наявні на той час дані літератури щодо синергізму антимікробної дії ефірних олій (зокрема й ефірної олії чайного дерева) з іншими біоцидами (зокрема антибіотиками та синтетичними антифунгальними засобами) та окреслили перспективи подальшого практичного використання таких сумішей.

Висновки

Одержані результати підтверджують поодинокі поки що дані про синергізм антимікробної активності поверхнево-активних речовин мікробного походження з антибіотиками й ефірними оліями. Важливо, що використання суміші мікробних ПАР з такими біоцидами дає змогу на порядки знизити мінімальні інгібуючі концентрації антибіотиків ципрофлоксацину й офлоксацину, а також ефірних олій.

Література

1. Aslam B., Wang W., Arshad M. I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M. H., et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* 2018(11): 1645—1658. doi:10.2147/idr.s173867.
2. Founou R. C., Founou L. L., Essack S. Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017; 12(12). doi: 10.1371/journal.pone.0189621.
3. Owen L., Laird K. Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. *Crit. Rev. Microbiol.* 2018; 44(4), 414—435. doi: 10.1080/1040841X.2018.
4. Aghraz A., Benameur Q., Gervasi T., Ait dra L. Antibacterial activity of *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* essential oils alone and in combination with conventional antibiotics against *Enterobacteriaceae* isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 2018; 67(2), 175—182. doi: 10.1111/lam.
5. Haba E., Bouhdid S., Torrego-Solana N., et al. Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J. Pharm.* 2014; 4761(1—2), 134—141. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.039.
6. Пирог Т. П., Софилканич Л. П., Покора К. А., Шевчук Т. А., Путинская Г. А. Синтез поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB-7405 на промышленных отходах. *Микробиол. журн.* 2014; 76(2): 17—23.
7. Pirog T., Sofilkanych A., Shevchuk T., Shulyakova M. Biosurfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017: synthesis intensification and practical application. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013; 170: 880—894. doi 10.1007/s12010-013-0246-7.
8. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Петренко Н. М., Палійчук О. І., Іутинська Г. О. Вплив умов культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на властивості синтезованих поверхнево-активних речовин. *Мікробіол. журнал.* 2018; 84(4): 13—27. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.013>.
9. Тарасенко Д. О. Модифікація методу кількісного визначення поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. *Харчова промисловість*. К.: НУХТ, 2008, № 7. С. 40—42.
10. Mohamed S. H., Mohamed M. S. M., Khalil M. S., Azmy M., Mabrouk M. I. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumonia*. *J. Appl. Microbiol.* 2018; 125(1), 84—95. doi: 10.1111/jam.13755.
11. Ardi M. S., Aroua M. K., Hashim N. A. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renew. Sustainable Energy.* 2015; 42, 1164—1173. doi:10.1016/j.rser.2014.10.091.
12. Patil P. D., Gude V. G., Reddy H. K., Muppaneni T., Deng S. Biodiesel production from waste cooking oil using sulfuric acid and microwave irradiation processes. *J. Environ. Protec.* 2012; 3: 107—113. doi:10.4236/jep.2012.31013.
13. Bhatnagar K., Wong A. The mutational landscape of quinolone resistance in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2019; 14(11): e0224650. doi: 10.1371/journal.pone.0224650.

14. Zhao L., Wang S., Li X., He X., Jian L. Development of in vitro resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2020; 9:124. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00793-8>.
15. Umar A. I., Garba I., Jidda M. L., Ganau A. M., Fana A. S., et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ear and wound swabs in some selected hospital laboratories in Sokoto Metropolis, Nigeria. *Calabar J. Health Sci*. 2019; 3(1); 31—35. doi: 10.25259/CJHS_8_2019.
16. Raja Ram G., Prashanna M., Ganga G. C. Antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* with reference to MRSA isolates from pediatric patients. *Future Sci*. 2020; 6(4). DOI: 10.2144/fsoa-2019-0122.
17. Talei G.-R., Mohammadi M., Bahmani M., Rafieian Kopaei M. Synergistic effect of *Carum copticum* and *Mentha piperita* essential oils with ciprofloxacin, vancomycin, and gentamicin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Int. J. Pharm. Investig*. 2017; 7(2), 82—87. doi: 10.4103/jphi.JPHI 12 17.
18. Maheshwari M., Safar Althubiani A., Hasan Abulreesh H., Abul Qais F., Shavez Khan M., Ahmad I. *Bioactive extracts of Carum copticum L. enhances* efficacy of ciprofloxacin against MDR enteric bacteria. *Saudi J. Biol. Sci*. 2018; 26(7): 1848—1855. doi:10.1016/j.sjbs.2017.12.008.
19. Lahmar A., Bedoui A., Mokdad-Bzeouich I., Dhaoui Z., Kalboussi Z., et al. Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. *Microb. Pathogen*. 2017; 106: 50—59. doi:10.1016/j.micpath.2016.10.018.
20. Haq A., Siddiqi M., Batool S. Z., Islam A., Khan A., Khan D., et al. Comprehensive investigation on the synergistic antibacterial activities of *Jatropha curcas* pressed cake and seed oil in combination with antibiotics. *AMB Express*. 2019; 9(1): 67. doi: 10.1186/s13568-019-0793-6.
21. Пирог Т. П., Никитюк Л. В., Шевчук Т. А. Синергізм антимікробної активності поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 та антибіотиків. *Мікробіол. журнал*. 2017; 29(4): 30—39. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.04.030>.
22. Пирог Т. П., Никитюк Л. В. Синергічна дія поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 і антифунгальних засобів. *Наукові праці НУХТ*. 2017; 23(1): 58—65.
23. Pirog T. P., Kliuchka L. V., Kliuchka I. V., Shevchuk T. A., Iutynska G. O. Synergism of antimicrobial and anti-adhesive activity of *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 surfactants in a mixture with essential oils. *Mikrobiol. Z*. 2020; 82(4): 31—40. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj82.04.031>.
24. Пирог Т. П., Конон А. Д., Скочко А. Б. Використання мікробних поверхнево-активних речовин у біології та медицині. *Біотехнологія*. 2011; 4(2): 24—38.
25. Pirog T. P., Kliuchka I. V., Kliuchka L. V. Synergistic action on microorganisms of complex of essential oils with the biocides. *Biotechnology Acta*. 2019; 12(4): 5—18.