

LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA



Rūta Mickienė

ETERINIŲ ALIEJŲ POVEIKIS GYVULIŲ APLINKOS MIKROORGANIZMAMS

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina (12B)

Kaunas, 2009

Daktaro disertacija rengta 2005–2009 metais Lietuvos veterinarijos akademijoje, Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedroje.

Moksliniai tyrimai atlikti Lietuvos veterinarijos akademijos Gyvūnų gerovės laboratorijoje ir Hanoverio veterinarinės medicinos universitete Gyvūnų higienos, gerovės ir elgsenos institute.

Mokslinio darbo vadovas –

Prof. dr. Bronius Bakutis (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Mokslinio darbo konsultantė –

Doc. dr. Marija Stankevičienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Veterinarinės medicinos mokslo krypties taryba:

Pirmininkė –

E. prof. p. dr. Albina Aniulienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Nariai:

Prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (Vilniaus universitetas Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

Doc. dr. Ona Ragažinskienė (VDU Vaistinių augalų mokslo sektorius, biomedicinos mokslai, farmacija – 09 B);

Doc. dr. Rasa Želvytė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

Doc. dr. Vytuolis Žilaitis (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Oponentai:

E. doc. p. dr. Alvydas Malakauskas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

Doc. dr. Ona Motiejūnaitė (Vilniaus pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Disertacija bus ginama viešame Veterinarinės medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2009 m. gruodžio 21 d. 14 val. Lietuvos veterinarijos akademijoje dr. S. Jankausko auditorijoje.

Adresas: Tilžės g. 18, 47181 Kaunas, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2009 m. lapkričio 21 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos veterinarijos akademijos ir LVA Veterinarijos instituto bibliotekose.

LITHUANIAN VETERINARY ACADEMY

Rūta Mickienė

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS IN ENVIRONMENT ANIMALS

Doctoral dissertation
Biomedical sciences, veterinary (12 B)

Kaunas, 2009

The doctoral dissertation was prepared at the Lithuanian Veterinary Academy, Department of Food Safety and Animal Hygiene, in 2005–2009.

The research was carried out in the Institute of Animal Hygiene, Animal Welfare and Behaviour of Farm Animals, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany, and in the Animals Welfare Laboratory at the Lithuanian Veterinary Academy.

Research supervisor –

Prof. Dr. Bronius Bakutis (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary – 12 B).

Research consultant–

Assoc. Prof. Dr. Marija Stankevičienė (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary – 12 B).

Chairman of the veterinary medicine council –

Acting Prof. Dr. Albina Aniulienė (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary – 12 B).

Members:

Prof. Habil. Dr. Aniolas Sruoga (Institute for Ecology Research, Vilnius University, Biomedical Sciences, Biology – 01 B);

Assoc. Prof. Dr. Ona Ragažinskienė (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Pharmacy – 09 B);

Assoc. Prof. Dr. Rasa Želvytė (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary – 12 B);

Assoc. Prof. Dr. Vytuolis Žilaitis (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary – 12 B).

Oponents:

Assoc. prof. Dr. Alvydas Malakauskas (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary – 12 B);

Assoc. Prof. Dr. Ona Motiejūnaitė (Pedagogical University Vilnius, Biomedical Sciences, Biology – 01 B).

Public defence of doctoral dissertation in Veterinary medicine science council will take place at the Lithuanian Veterinary Academy Dr. S. Jankauskas auditorium 2 pm 21 of December 2009.

Addresass: Tilžės str. 18, 47181 Kaunas, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was sent on 21th November, 2009 according to the confirmed address list. This doctoral dissertation is available at the library of the Lithuanian Veterinary Academy and LVA Veterinary Institute.

IVADAS

Tvartų aplinkos ore esančios dalelės susideda iš dulkių ir oro mikroorganizmų, bendrai vadinamų bioaeroliais (Carpenter, 1986; Radon, 2002; Bakutis et al., 2004). Oro mikroorganizmai adsorbuojasi prie ore esančių dulkių. Mažesnės nei 5 µm dydžio dulkės su mikroorganizmais gali patekti į kvėpavimo takus, plaučių alveoles ir sukelti susirgimus – pneumonija, astmą, bronchitą, rinitą (Atin et al., 2002; Crook et al., 1991; Donham et al., 1986; Olson, 1996). Kvėpavimo takų susirgimai dažnai pasitaiko kiaulių fermose dirbantiems žmonėms (Iversen et al., 1988; Mackiewicz, 1998; Rautiala, 2003; Zejda et al., 1993). Todėl labai svarbu sumažinti dulkių ir bioaerolių koncentraciją tvartų ore.

Tvartuose bioaerolių ir dulkių mažinimui yra naudojama oro dezinfekcija, filtracija, oras gryninamas naudojant vandens aerozolius. Tačiau siekiama surasti medžiagą, kuri būtų nekenksminga aplinkai, ekologiška ir būtų galima naudoti oro dezinfekcijai tvarte esant gyvuliams.

Jau 1936 metais Risleris testavo eterinių aliejų antimikrobinį aktyvumą. 1954 metais Kellneris ir Kobertas tyrinėjo eterinių aliejų poveikį oro mikroorganizmams.

Eteriniai aliejai, tai lakūs, kvapūs, koncentruoti cheminiai junginiai gaunami iš augalų žiedų, pumpurų, sėklų, lapų, šakelių, žievės, medienos, vaisių, šaknų (Guenther, 1948; Hansel et al., 1999). Pagrindiniai eterinių aliejų gavybos būdai yra augalinės žaliavos distiliacija vandens garais, bet gali būti išgaunami ir naudojant anfleražą ar tirpiklio ekstrakciją (Van de Braak, 1999).

Yra žinoma apie 3000 eterinių aliejų, iš kurių 300 yra naudojami – daugiausia kvėpalų rinkoje (Van de Braak, 1999). Jau senai yra pripažinta, kad eteriniai aliejai turi antimikrobinį savybių (Boyle, 1955; Guenther, 1948). Be antibakterinių savybių (Carson et al., 1995; Deans et al., 1987; Mourey et al., 2002), eteriniai aliejai ir jų cheminiai junginiai turi antivirusinių, (Bishop, 1995), mikromicetus slopinančių savybių (Akgül et al., 1988; Azzouz et al., 1982; Jayashree et al., 1999; Mari et al., 2003) antitoksinių (Akgül et al., 1991; Juglal et al., 2002; Ultee et al., 2001), antiparazitinių (Pandey et al., 2000; Pessoa et al., 2002) ir insekticidinių savybių (Karpouhtsis et al., 1998; Konstantopoulou et al., 1992).

Darbo tikslas

Nustatyti eterinių aliejų antimikrobinį veikimą *in vitro* ir įvertinti galimybę juos panaudoti tvartų oro mikrobiniam užterštumui mažinti.

Uždaviniai

1. Nustatyti diskų difuzijos metodu mikroorganizmų jautrumą *in vitro*

pasirinktiems eteriniams aliejams.

2. Nustatyti skiedimo metodu mikroorganizmų jautrumą *in vitro* pasirinktiems eteriniams aliejams.

3. Nustatyti skiedimo metodu pasirinktų eterinių aliejų kombinacijų aktyvumą mikroorganizmams *in vitro*.

4. Nustatyti antimikrobines eterinių aliejų savybes naudojant emulgatorių ir *Escherichia coli* bakterijų kultūrą.

Darbo naujumas

Lietuvoje pirmą kartą plačiai ištirtas antimikrobinis eterinių aliejų veikimas *in vitro*. Atrinkti eteriniai aliejai, kurie pasižymėjo antimikrobinio poveikiu Gram-teigiamoms (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*) ir Gram-neigiamoms (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) bakterijų kultūroms, mikromicetams: *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ir mieles *Candida albicans*. Tyrimais nustatytos eterinių aliejų minimalios slopinančios mikroorganizmų augimą koncentracijos. Įvertinus eterinių aliejų kombinacijų antimikrobinį aktyvumą, buvo atrinktos didžiausiu antimikrobinio aktyvumu pasižyminčios kombinacijos. Buvo įvertintos sojų lecitino kaip emulgatoriaus ir stabilizatoriaus panaudojimo galimybės ir nustatyta, kad lecitinas mažina eterinių aliejų antimikrobinį aktyvumą.

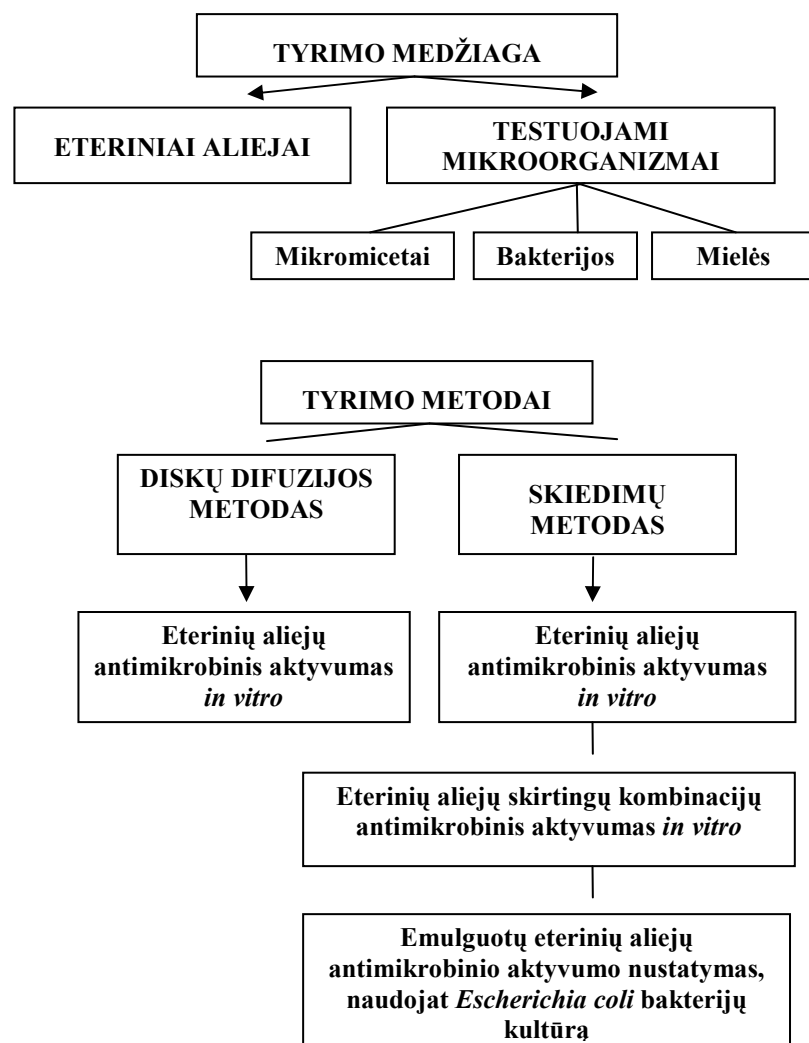
Praktinė darbo reikšmė

Kadangi stipriausią antimikrobinį veikimą prieš tyrimams naudotas gyvulių aplinkos bakterijas ir mikromicetus turėjo eteriniai aliejai: *Thymus vulgaris* L. (čiobrelų), *Mentha piperita* (pipirmėtės), *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) ir *Cymbopogon citratus* (citrinžolių), šie eteriniai aliejai ir šių aliejų kombinacijos gali būti pritaikomi tvartų oro mikrobiniam užterštumui mažinti.

Disertacijos struktūra ir apimtis. Disertaciją sudaro įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų metodika, rezultatų išdėstymas, gautų rezultatų apibendrinimas, išvados, pasiūlymai, santrauka lietuvių kalba, publikacijų sąrašas. Darbe pateikiama 7 lentelės ir 43 paveikslų. Disertacijos apimtis 115 puslapių.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Tiriamasis darbas atliktas 2005-2009 metais Lietuvos veterinarijos akademijoje, Gyvūnų gerovės laboratorijoje ir Hanoverio veterinarinės medicinos universitete, Gyvūnų higienos, gerovės ir elgsenos institute.



1 pav. Darbo schema
Figure 1. Scheme experiments

Eteriniai aliejai

Naudoti 100% koncentracijos eteriniai aliejai: *Eucalyptus globules* (eukaliptų), *Eucalyptus polybretea* (eukaliptų), *Cymbopogon citratus* (citrinžolių), *Citrus decumana* (greipfrutų), *Citrus aurantium* (apelsinų), *Citrus paradisi* (greipfrutų), *Lavandula officinalis* (levandų), *Picea abies* L.(eglių), *Pinus pumili* (pušų), *Salvia officiunalis* (vaistingųjų šalavijų), *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių), *Mentha piperita* (pipirmėtės), *Mentha arvensis* (mėtų), *Thymus vulgaris* (čiobrelų), *Zingibe officinales* (imbierių) (Oil manufacturer, Sensient Essential oils, GmgH, Vokietija).

Mikromicetų kultūros

Iš gyvulių tvartų oro buvo išskirtos mikromicetų kultūros: *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* ir *Aspergillus oryzae*. Mikromicetai išskirti iš tvartų oro sedimentacijos būdu pagal Kochą. Tyrimų vietose atidengtos Petri lėkštelės su agarizuota Čapeko terpe (Czapek dox agar, Liofilchem S. r .l., Via Scozia 64026 Roseto d. A. (TE) Italija) laikytos 10 min. Nustatyta, kad vidutiniškai per 5 min. ant 100 cm² Petri lėkštelės ploto mikroorganizmų nusėda iš 3 l oro. Lėkštelės kultivuotos termostate 25±2°C temperatūroje. Mikromicetai auginti 10 parų. Iš oro išskirtų mikromicetų koncentracija apskaičiuota kolonijas sudarančių vienetų skaičiumi kubiniame metre (KSV/m³). Iš išaugusių grybų kolonijų išskirtos monokultūros. Morfologiniai ir kultūriniai požymiai ištirti šviesinės mikroskopijos metodu. Mikromicetų rūšys identifikuotos vadovaujantis literatūros šaltiniuose pateiktais rūšių aprašymais (Domsch et al., 1980; Ellis, 1976; Gams, 1971; Lugauskas ir kt., 2002; Nelson et al., 1983; Ramirez, 1982; Samson and Van Reenen-Hoekstra, 1988).

Eterinių aliejų antimikrobinio (fungistatinio) aktyvumo nustatymas diskų difuzijos metodu

Mikromicetai resuspenduoti steriliame 0,85% fiziologiniame tirpale iki 0,5 Mac Farland vieneto optinio tankio. 1 ml tiriamosios mikromicetų kultūros suspencijos pasėtos į atskiras Petri lėkšteles su ištirpinta ir iki 47°C temperatūros atvėsinta agarizuota Čapeko terpe (Czapek dox agar, Liofilchem S. r .l., Via Scozia 64026 Roseto d. A. (TE) Italija). Eterinių aliejų antigrybinėms savybėms nustatyti naudoti filtrinio popieriaus diskai (6 mm) (Odds, 1989; Hadacek and Greger, 2000). Sterilūs filtrinio popieriaus diskai sudrėkinti 10 µl skirtingu 100% koncentracijos eteriniu aliejumi ir padėti Petri lėkštelės centre ant sustingusios Čapeko terpės su mikromicetų ląstelėmis. Petri lėkštelės su pasėtomis kultūromis ir filtrinio popieriaus diskais, sudrėkintais tiriamais eteriniais aliejais, 7–10 parų kultivuotos 25±2°C temperatūroje. Kultivavimo pabaigoje liniuote išmatuotas spindulys (mm), susidaręs apie popierinį diską ir parodantis

eterinio aliejaus efektyvumą. Jei susidaręs spindulys apie suvilgytą diską siekė 10 mm ar daugiau, laikyta, kad eterinio aliejaus veikimas yra antigrybinis (Lima et al., 1993). Bandymai kartoti penkis kartus.

Eterinių aliejų minimalios antimikrobinės slopinamosios koncentracijos nustatymas

Eteriniams aliejams testuotiems diskų difuzijos metodu ir turintiems antimikrobinį aktyvumą (sudariusiems skaidrų spindulį apie suvilgytą popierinį diską iki 10mm), nustatoma minimali slopinamoji koncentracija (MSK) difuzijos į agarą su įdubomis metodu (Hadacek and Greger, 2000).

Mikromicetai iki 0,5 Mac Farland vieneto optinio tankio resuspenduoti 0,85% steriliame fiziologiniame tirpale. 1 ml tiriamosios mikromicetų kultūros suspensijos pasėtos į atskiras Petri lėkšteles su ištirpinta ir iki 47°C temperatūros atvėsinta agarizuota Čapeko terpe. Terpei sustingus, padarytos 6 mm įdubos, į kurias įpilta po 50 µl skirtingos koncentracijos: 0,5%; 1%; 2%; 4%; 8% - eterinio aliejaus. Eterinių aliejų skirtingoms koncentracijoms gauti naudota „Tween 20“ (Aniara – JAV) ir sterilus distiliuotas vanduo. Maišoma 5 min. Kultivuota 7–10 dienų 25°C temperatūroje. Antigrybinis poveikis vertintas pagal skaidrių zonų susidariusių aplink įdubas, skersmenį, išreikštą mm. Skaidri zona siekianti 10 mm spindulį sudaro minimalią slopinamąją koncentraciją. Jei aplink įdubas su skirtingomis eterinių aliejų koncentracijoms nesusidaro skaidri zona, manoma, kad tirtos medžiagos koncentracija tiriamai kultūrai fungistatinio poveikio neturi. Bandymai kartoti penkis kartus.

Mikroorganizmų kultūros

Tyrimuose testuotos Gram + (*Staphylococcus aureus* DSM-No. 799, *Enterococcus faecium* DSM-No. 2918), ir Gram – (*Pseudomonas aeruginosa* DSM-No. 939, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* DSM-No. 788) bakterijų kultūros ir mielės *Candida albicans* DSM-No. 1386. Mikroorganizmų kultūros gautos iš mikroorganizmų banko Vokietijoje (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Šie mikroorganizmai dažniausiai naudojami dezinfekcinėms medžiagoms testuoti (Bodenschatz, 1997).

Eterinių aliejų antimikrobinio aktyvumo nustatymas diskų difuzijos metodu

Mikroorganizmų kultūros resuspenduotos steriliu peptono vandeniui (PW; Oxoid, LTD, Basingstoke, Hampshire, UK) pagal Mac Farlando vieneto optinį tankį ir sudaro 10^5 - 10^6 KSV/ml. 50 µl suspensijos tolygiai paskleista Petri lėkštelėse su Bloodagar-Base N. 2 (Oxoid, UK) mitybine terpe bakterijoms, Malt Extract Agar (Oxoid, UK) – mielėms, ir DG-18 (Oxoid, UK) – mikromicetams. Sterilūs 6 mm skersmens popieriniai diskai sudrėkinti 10 µl 100% eteriniais aliejais sudedami ant mitybinės terpės su

mikroorganizmais. Petri lėkštelės laikomos vieną valandą kambario temperatūroje, vėliau lėkštelės su bakterijomis inkubuojamos termostate 37°C, 24 val. Lėkštelės su mikromicetais inkubuojamos 25±2°C temperatūroje 7–10 dienas. Kultivavimo pabaigoje liniuote išmatuotas spindulys (mm), susidręs apie popierinį diską ir pagal spindulio ilgį sprendžiama apie eterinio aliejaus efektyvumą. Jei susidaręs spindulys apie suvilgytą diską siekia 10 mm ir daugiau - eterinio aliejaus veikimas yra antimikrobinis (Lima et al., 1993). Bandymai kartoti penkis kartus.

Eterinių aliejų minimalios slopinančios koncentracijos nustatymas skiedimo metodu

Skiedimų metodas naudotas nustatyti minimaliai slopinančiai koncentracijai remiantis standartais (NCCLS, 2001).

Eterinių aliejų praskiedimai atlikti nuo 0,1 iki 50%. Skiedimams atlikti naudota peptono vandenį (Oxoid, UK). Kontrolei naudojamas peptono vanduo + mikroorganizmas. Mikroorganizmų suspensija paruošta pagal 0,5 MacFarland vieneto optinio tankio standartą. 50 µl mikroorganizmų suspensijos ir 50 µl skirtingos koncentracijos (0,1-50%) eterinių aliejų įterpta į mikrošulinėlius ir inkubuota 37°C temperatūroje 24 val. 100 µl mikroorganizmų vandens peptono-eterinio aliejaus suspensija ištirpinta mėgintuvėliuose su 0,02% Tween 80 (Sigma). 100 µl suspensijos paskleista ant agaro Petri lėkštelėse: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* buvo kultivuota ant Blood Agar Base N.2 (Oxoid, UK) 37°C temperatūroje 24 val., *Pseudomonas aeruginosa* buvo kultivuota ant Blood Agar Base N.2 - 30°C temperatūroje 24 val.; *Candida albicans* - Malt Extract-Agar (Oxoid, UK) 25°C temperatūroje 48 val.

Eterinių aliejų emulgavimas

Sustiprinti eterinių aliejų antimikrobinėms savybėms buvo naudojamas emulgatorius - sojų lecitinas (Aurica Naturheilmittel und Naturwaren GmbH). Į sterilius mikrošulinėlius įpilta 50 µl *Escherichia coli* (paruoštos pagal 0,5 MacFarland vieneto optinio tankio standartą) suspensijos ir 50 µl vandens peptono-eterinio aliejaus (koncentracijos 0,5-50%)–lecitino (koncentracija 0,5-10%), inkubuota 37°C temperatūroje 24 val. 100 µl mikroorganizmų-peptono vandens-eterinio aliejaus- lecitino suspensijos ištirpinta mėgintuvėliuose su 0,02% Tween 80 (Sigma). 100 µl ištirpintos suspensijos paskleista ant agaro Blood Agar Base N. 2 (Oxoid, UK). Inkubuota 37°C temperatūroje 24 val. Po inkubacijos termostate bakterijų kolonijos suskaičiuotos.

Eterinių aliejų kombinacijų minimalios slopinančios koncentracijos nustatymas skiedimo metodu.

Skiedimų metodu buvo nustatytas kombinuotas eterinių aliejų veikimas:

Malaleuca alternifolia ir *Mentha arvensis*, *Malaleuca alternifolia* ir *Cymbopogon citratus*, *Malaleuca alternifolia* ir *Zingibe officinales*, *Cymbopogon citratus* ir *Mentha arvensis*, *Cymbopogon citratus* ir *Zingibe officinales*.

Kombinuotas eterinių aliejų veikimas nustatytas naudojant peptono vandenį (Oxoid, LTD, Basingstoke, Hampshire, UK). Eterinių aliejų praskiedimai paruošti skirtingų koncentracijų spektru nuo 0,01 iki 50%. Kontrolė buvo peptono vanduo+mikroorganizmas ir viena sterili kontrolė.

Bakterijų kultūros resuspenduotos steriliame 0,85% fiziologiniame tirpale iki 0,5 Mac Farland vieneto optinio tankio. Bakterijų suspensijos įterptos į mikrošulinėlius. Mikroorganizmų suspensijos 50 µl ir 50 µl skirtingos koncentracijos (0,01-50%) eterinių aliejų buvo išpilstyta į mikrošulinėlius ir inkubuota 37°C temperatūroje 24 val. 100 µl mikroorganizmų–vandens peptono-eterinių aliejų suspensija ištirpinta mėgintuvėliuose su 0,02% Tween 80 (Sigma). 100 µl suspensijos paskleista ant agarų Petri lėkštelėse. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* buvo kultivuota ant Blood Agar Base N. 2 (Oxoid, UK) 37°C temperatūroje 24 val., *Pseudomonas aeruginosa* buvo kultivuota ant Blood Agar Base N. 2 30°C temperatūroje 24 val., *Candida albicans* buvo kultivuota ant Malt Extract-Agar (Oxoid, UK) at 25°C temperatūroje 48 val.

Satistinė analizė

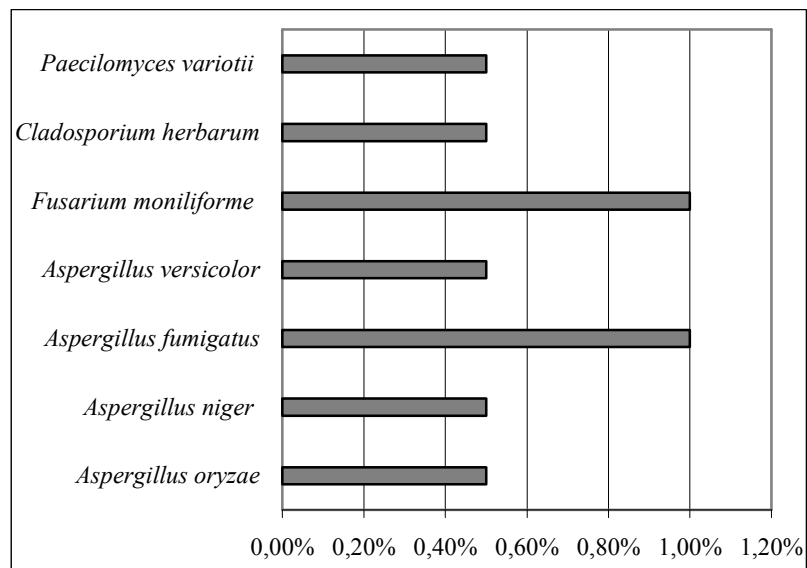
Visi bandymai kartoti po penkis kartus. Statistinė analizė atlikta “SPSS Windows”, 12,0 versija ir “Microsoft Office Excel 2003” statistiniais paketais. Apskaičiuoti aritmetiniai vidurkiai (X), standartinė vidurkio paklaida, vidutinis kvadratinis nuokrypis (S), vidutinė kvadratinė paklaida (Sx), CV, % – variacijos koeficientas. Skirtumų patikimumas apskaičiuotas pagal Studento (t) kriterijų, kai paklaidos tikimybė $p < 0,05$.

TYRIMŲ REZULTATAI

I. Dalis. Eterinių aliejų poveikis mikromicetams, išskirtiems iš tvarto oro

Vertinant eterinių aliejų antigrybinį poveikį, parinktos septynios mikromicetų kultūros. Mikromicetų kultūros buvo skirtingai jautrios skirtingiems eteriniams aliejams. Mažiausiu antigrybiniu poveikiu pasižymėjo *Picea abies* L. (pušų) eterinis aliejus. Lėkštelėse su *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium moniliforme* – *Picea abies* L. (pušų) eterinis aliejus buvo neveiksmingas. 2004 m. O. Motiejūnaitė tyrimais su mikroorganizmais – mikromicetais, mieliagrybiais, mielėmis, bakterijomis – nustatė, kad jautriausiai į pušies lakiąsias medžiagas reaguoja bakterijos. Mažiausia pušies aliejaus koncentracija, slopinusi visų trijų

mikroorganizmų vystymąsi, buvo 2,5% aliejaus terpė. Iš mikromicetų pušies eterinis aliejus stipriausiai slopino mikromiceto *Ulocladium oudemansii* augimą. Mūsų tyrimais su pušų lakiomis medžiagomis minimali skaidri zona (10 mm) susidarė tik lėkštelėse su *Cladosporium herbarum* kultūra. Antigrybinį poveikį prieš *Cladosporium herbarum* turi *Cinnamomum zeylanicum* eterinis aliejus, kurio minimali slopinamoji koncentracija – 125 µl/ml (Moreira et al., 2007). Tokiu pat silpnu antigrybiniu veikimu pasižymėjo ir *Citrus paradisi* (greipfrutų) eterinis aliejus. Minimalios skaidrios zonos, siekančios nuo 8,4±0,55 iki 10,20±0,84 mm, susidarė tik lėkštelėse su *Paecilomyces variotii* ir *Cladosporium herbarum* kultūromis. *Citrus paradisi* antigrybinio poveikio neturėjo ir *Aspergillus* spp. genties mikromicetams. Lėkštelėse su šiais grybais skaidrių zonų ribos siekė nuo 1,4±0,55 iki 5,0±0,71 mm. Stipresniu antigrybiniu poveikiu išsiskyrė *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių), *Citrus aurantium* (apelsinų) ir *Eucalyptus globulus* (eukaliptų) eteriniai aliejai. Jais suvilgyti diskai skaidrias zonas sudarė nuo 10,6±0,55 iki 38,0±1,0 mm. Jautriausiai į *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) eterinį aliejų reagavo *Cladosporium herbarum* kultūra: skaidrios zonos lėkštelėje siekė 38,0±1,0 mm. Mažiausias slopinimo zonas, siekiančias iki 27,4±0,55 mm, sudarė *Aspergillus niger*. *Citrus aurantium* (apelsinų) ir *Eucalyptus globulus* (eukaliptų) eteriniai aliejai visus mikromicetus veikė silpniau už *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) eterinį aliejų. *Aspergillus niger* mikromicetus veikia *Lippia alba* eterinis aliejus – sudaro 24 mm slopinimo zoną, minimali slopinamoji koncentracija – 4%, nors yra duomenų, kad šis aliejus turi stipresnį antibakterinį nei antigrybinį poveikį (Lemos et al., 1990; Lima, 1996). Stipriausiai grybus veikė *Mentha piperita* (pipirmėčių) ir *Thymus vulgaris* L. (čiobrelių) eteriniai aliejai. Jie efektyviai veikė visas mūsų pasirinktas kultūras ir sudarė maksimalias 40,0±0,0 mm skersmens slopinimo zonas. Kadangi *Mentha piperita* (pipirmėčių) ir *Thymus vulgaris* L. (čiobrelių) eteriniai aliejai sudarė maksimalias skaidrias zonas, o *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) taip pat stipriai veikė grybus, šiems eteriniams aliejams nustatėme minimalias slopinamąsias koncentracijas. S. Shin ir S. Lim 2004 m. nustatė, kad *Thymus vulgaris* (čiobrelių) ir *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) eteriniai aliejai taip pat stipriai veikia ir *Trichophyton* spp. mikromicetus. Tyrimų su *Trichophyton* spp. mikromicetais metu *Eucalyptus globulus* (eukaliptų) minimali slopinamoji koncentracija siekė 0,25 mg ml⁻¹, *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) – 1 mg ml⁻¹, *Thymus vulgaris* (čiobrelių) – 1 mg ml⁻¹.

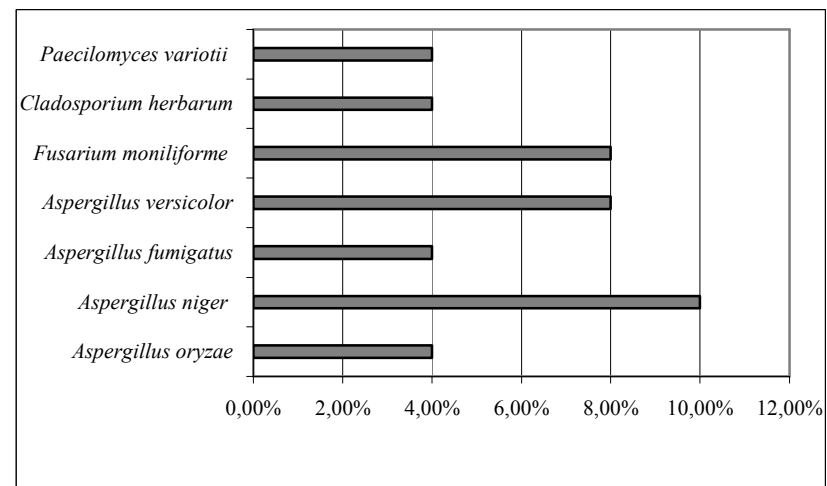


2 pav. *Thymus vulgaris* L. (čiobrelių) eterinio aliejaus minimali slopinamoji koncentracija

Figure 2. MIC values of *Thymus vulgaris* L.

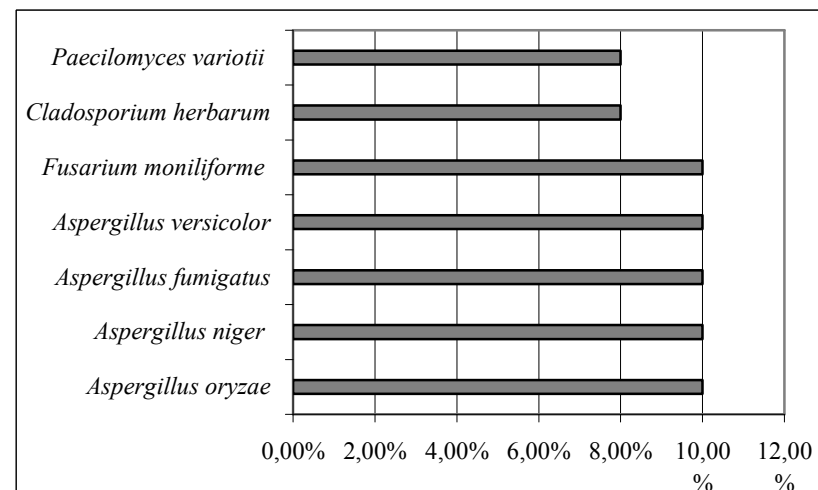
Buvo nustatyta, kad prieš *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Paecilomyces variotii* mikromicetus mažiausia slopinamoji koncentracija buvo *Thymus vulgaris* (čiobrelių) eterinio aliejaus (2 pav.). Lėkštelėse su *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* jau 0,5% *Thymus vulgaris* (čiobrelių) eterinis aliejus sudarė minimalias zonas, siekiančias 10 mm. Šiek tiek didesnės koncentracijos reikėjo *Aspergillus fumigatus* ir *Fusarium moniliforme* mikromicetams, kai minimalią slopinamąją koncentraciją sudarė 1,0%.

Mentha piperita (pipirmėčių) eterinio aliejaus minimali slopinamoji koncentracija buvo nuo 4 iki 10%. Lėkštelėse su *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus oryzae* mikromicetais minimali slopinamoji koncentracija siekė 4%, o lėkštelėse su *Aspergillus versicolor*, *Fusarium moniliforme* – 8%.



3 pav. *Mentha piperita* (pipirmėčių) eterinio aliejaus minimali slopinamoji koncentracija

Figure 3. MIC values of *Mentha piperita*



4 pav. *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) eterinio aliejaus minimali slopinamoji koncentracija

Figure 4. MIC values of *Malaleuca alternifolia*

Aspergillus niger pasiekė 10% koncentraciją *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) eterinis aliejus išsiskyrė didžiausia minimalia koncentracija: lėkštelėse su *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ir *Fusarium moniliforme* minimali slopinamoji koncentracija siekė iki 10%, lėkštelėse su *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum* mikromicetais – 8%.

II. Dalis. Eterinių aliejų antimikrobinio poveikio įvertinimas diskų difuzijos metodu

Diskų difuzijos metodu nustatytas antimikrobinis poveikis 100% eteriniams aliejams: *Eucalyptus polybretea* (eukaliptų), *Cymbopogon citratus* (citrinžolės), *Citrus decumana* (greipfrutų), *Lavandula officinalis* (levandų), *Pinus pumilio* (pušies), *Salvia officinalis* (šalavijo), *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių), *Mentha arvensis* (mėtų), *Zingibe officinales* (imbiero), naudojant dažniausiai aplinkoje aptinkamus mikroorganizmus *Escherichia coli* ir *Aspergillus niger*. *Malaleuca alternifolia*, *Cymbopogon Citratus* ir *Mentha arvensis* mikroorganizmų augimo slopinimo spindulys siekė nuo 8,0-14,6 mm, o 100% koncentracijos *Zingibe officinales* nesudarė net minimalios skaidrios mikroorganizmus slopinančios zonos (1 lentelė).

1 lentelė. Eterinių aliejų antimikrobinio aktyvumo slopinimo zonos (mm)

Table 1. Medium values of inhibition halos (mm) presented in the antimicrobial activity of essential oils

Essential oils \ Microbial strains	ASPERGILLUS NIGER	ESCHERICHIA COLI
<i>Eucalyptus polybretea</i> 100%	-	5,0±2,6
<i>Cymbopogon citratus</i> 100%	14,6 ±4,6	12,2±2,1
<i>Citrus decumana</i> 100%	-	2,6±1,5
<i>Lavandula officinalis</i> 100%	4,6±1,5	4,0±0,7
<i>Pinus pumilio</i> 100%	-	-
<i>Salvia officinalis</i> 100%	2,5±1,3	4,2±0,8
<i>Malaleuca alternifolia</i> 100%	12,8 ± 2,2	12,2±2,5
<i>Mentha arvensis</i> 100%	8,0±0,0	10,2±3,2
<i>Zingibe officinales</i> 100%	-	-

Eteriniai aliejai parodė stiprų antimikrobinį veikimą diskų difuzijos metodu ir *Zingibe officinales* neturėjęs antimikrobinio poveikio, testuoti

skiedimo metodu. Skiedimų metodu *Zingibe officinales* eterinio aliejaus minimali 0,5% slopinanti koncentracija buvo bakterijoms *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Proteus mirabilis* - ir procentinis bakterijų augimas buvo *St. aureus* 20±17,8% (p>0,05), *P. aeruginosa* 40±24,6% (p>0,05), *P. mirabilis* 23,44±5,9% (p<0,05). Bandymuose su *E. coli*, *C. albicans* ir *E. faecium* tyrimų rezultatai buvo panašūs – minimalios slopinančios koncentracijos procentas buvo žemas, *E. coli* auga 91,6±15,3% (p<0,05), *C. albicans* 86,5±14,7% (p<0,05) ir *E. faecium* 80,7±17,7% (p<0,05).

50,0% koncentracijos *Zingibe officinales* eterinis aliejus visiškai slopina bakterijų *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ir mielių *Candida albicans* augimą.

Stipriu antimikrobinio veikimu pasižymėjo *Cymbopogon citratus* eterinis aliejus. 0,1% *Cymbopogon Citratus* veikė *P. mirabilis* (4,39±3,36%) (*P. mirabilis*, p>0,05) ir *C. albicans* (14,4±11,4%) (*C. albicans* p>0,48) bakterijas. Visiškai *C. albicans* ir *P. mirabilis* bakterijų slopinimui reikėjo 0,5% koncentracijos *Cymbopogon Citratus* eterinio aliejaus.

0,5% koncentracijos *Cymbopogon Citratus* eterinis aliejus gerai slopino bakterijų augimą: *E. coli* (0,008±0,009%) (p>0,05), *E. faecium* (13,7±12,96%) (p>0,05); *P. aeruginosa* (25,6±19,9%) (p>0,05), *St. aureus* (0,77±1,195%) (p>0,05). *Cymbopogon Citratus* eterinis aliejus visiškai slopino *E. faecium* ir *P. aeruginosa* 5,0%, *E. coli* - 0,8%, *St. aureus* - 8,0% koncentracijų.

Bakterijos *C. albicans*, *P. mirabilis*, *S. aureus* ir *E. coli* jautrios sinergistiniam *Malaleuca alternifolia* ir *Cymbopogon Citratus* eterinių aliejų veikimui – bakterijų augimo slopinimo koncentracija siekė 0,05%. Stipresnių koncentracijų bakterijoms slopinti - 0,5% reikėjo *Cymbopogon Citratus* ir *Mentha arvensis* sinergistinio veikimo. *Malaleuca alternifolia* ir *Cymbopogon Citratus* 5% visiškai sumažina *P. aeruginosa* bakterijų augimą, 8% reikalingi slopinti *E. faecium* bakterijų augimą. *Cymbopogon Citratus* ir *Mentha arvensis* 8% reikalingi slopinti *Ps. aeruginosa* ir 10% reikalinga slopinti *E. faecium* bakterijas.

Skirtingų eterinių aliejų kombinacijų antimikrobinis aktyvumas

Eterinių aliejų 0,005% koncentracijos kombinacija *Malaleuca alternifolia* ir *Cymbopogon Citratus* mažina mikroorganizmų augimą: *St. aureus* (84,32±15,23%) (p<0,05), *P. mirabilis* (88,2±3,49%) (p<0,05), *C. albicans* (74,02±21,81%) (p<0,05) ir *E. coli* (89,38±8,53%) (p<0,05). Skiedimo metodu visiškai bakterijos neaugo 0,05% *Malaleuca alternifolia* ir *Cymbopogon Citratus* kombinacijoje. Minimalią baktericidinę koncentraciją

P. aeruginosa bakterijų kultūrai sudarė 5,0% ir *E. faecium* bakterijų kultūrai reikėjo 8,0%.

Eterinių aliejų kombinacija *Cymbopogon Citratus* ir *Zingibe officinales* parodė, kad bakterijoms *St. aureus*, *P. mirabilis*, *C. albicans*, *E. coli* minimali slopinanti koncentracija 0,05%. Naudojant koncentraciją 0,005% eterinių aliejų kombinacijos *Cymbopogon Citratus* ir *Zingibe officinales* bakterijos auga: *St. aureus* (82,22±8,96%) ($p<0,05$); *P. mirabilis* (94±3,08%) ($p<0,05$); *C. albicans* (62,68±22,18%) ($p<0,05$); *E. coli* (97,24±2,98%) ($p<0,05$). Minimali slopinanti koncentracija 8% reikalinga *P. aeruginosa*, ir *E. faecium* siekia 50,0%.

Naudojant 0,5% eterinių aliejų kombinaciją bakterijos auga: *P. aeruginosa* (23,06±6,24%) ($p<0,05$) ir *E. faecium* (0,6±0,54%) ($p<0,05$).

Eterinių aliejų kombinacija *Malaleuca alternifolia* ir *Mentha arvensis* stipriai slopino *P. mirabilis* (MSK=0,02%), *C. albicans* ir *E. coli* (MSK=0,05%). Ir bakterijų augimas buvo: *C. albicans* (0,07±0,04%) ($p>0,05$), *P. mirabilis* (0,26±0,15%) ($p>0,05$), *E. coli* (0,44±0,15%) ($p<0,05$). Bakterijos *E. faecium* ir *Ps. aeruginosa* buvo mažiau jautrios kombinacijai *Malaleuca alternifolia* ir *Mentha arvensis* - *E. faecium* augo (1,13±0,45%) ($p<0,05$) ir *Ps. aeruginosa* (40,14±13,81%) ($p<0,05$). *Malaleuca alternifolia* ir *Mentha arvensis* parodė minimalią baktericidinę koncentraciją: *E. faecium* 8,0%, *Ps. aeruginosa* ir *St. aureus* sudarė 5,0% minimalią baktericidinę koncentraciją. *St. aureus* minimali baktericidinė koncentracija ir bakterijų augimas siekė (0,022±0,008) ($p<0,05$).

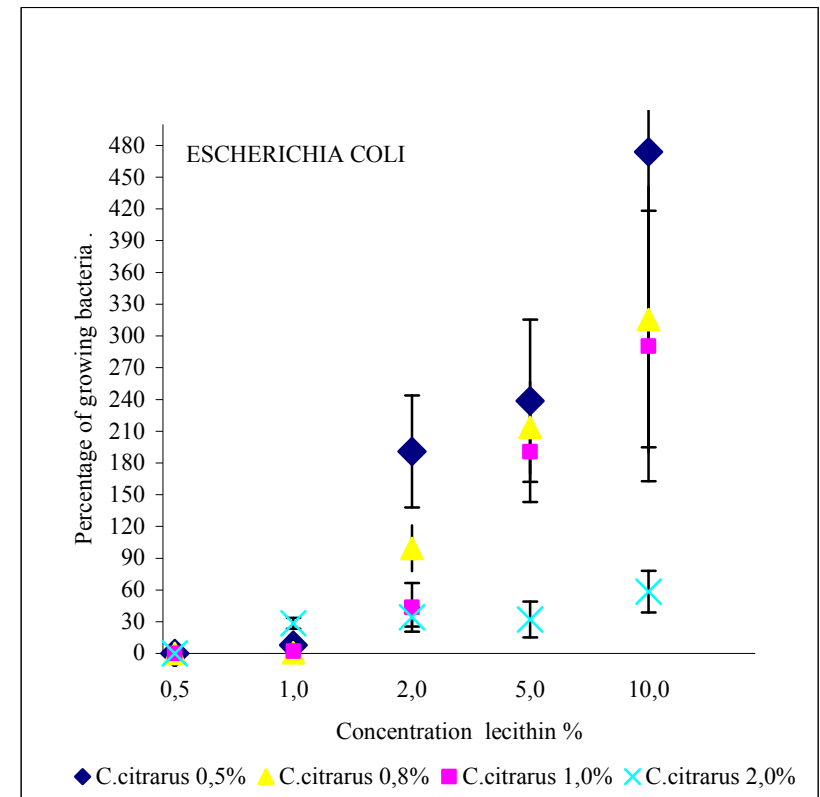
0,01% koncentracijos kombinacija *Malaleuca alternifolia* ir *Zingibe officinales* slopino bakterijų augimą *P. mirabilis* (0,54±0,38%) ($p>0,05$), *C. albicans* (0,048±0,004%) ($p<0,05$), *E. coli* (0,26±0,11%) ($p<0,05$), *St. aureus* (0,15±0,05%) ($p<0,05$). Minimali slopinanti koncentracija šioms bakterijoms sudarė 0,05%. *Ps. aeruginosa* ir *E. faecium* (MSK=8,0%). *E. faecium* bakterijos augo (1,06±0,52%) ($p>0,05$), *Ps. aeruginosa* (23,3±3,9) ($p<0,05$).

Kombinacija *Cymbopogon citratus* ir *Mentha arvensis* bakterijoms *St. aureus*, *P. mirabilis*, *C. albicans* ir *E. coli* sudarė 0,5% minimalią baktericidinę koncentraciją. Esant 0,005% koncentracijai bakterijų augimo procentas - *St. aureus* (90,16±8,6%) ($p<0,05$), *P. mirabilis* (92,4±4,09%) ($p<0,05$), *C. albicans* (76,48±19,36%) ($p<0,05$), *St. aureus* (90,16±8,5%) ($p<0,05$), *E. coli* (97,06±2,09%) ($p<0,05$). *Ps. aeruginosa* minimali baktericidinė koncentracija 8,0%. Aukštesnė koncentracija *E. faecium* MSK=10%.

Eterinių aliejų antimikrobinis aktyvumas kombinacijoje su lecitinu

Atliktas tyrimas su antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiu eteriniu

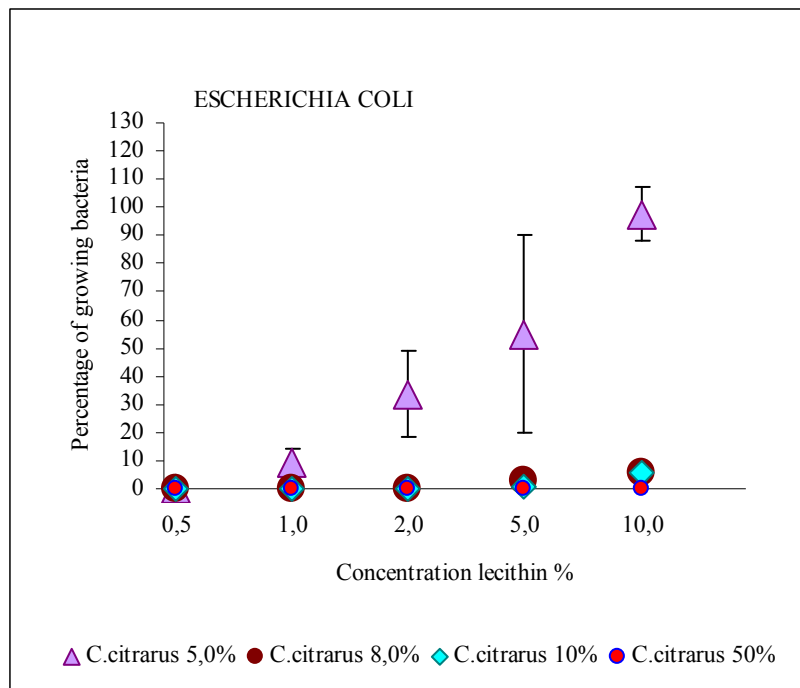
aliejumi *Cymbopogon citratus* ir *Escherichia coli* bakterijų kultūra. Naudojant tyrimuose 0,5% *Cymbopogon citratus* ir lecitiną, 1,0%, *E. coli* auga (7,8±0,6%).



5 pav. *Cymbopogon citratus* (0,5%; 0,8%; 1,0%; 2,0%) ir lecitino (0,5%;1,0%;2,0%;5,0%;10,0%) poveikis *E. coli*

Figure 5. Effect of *Cymbopogon citratus* (0,5%; 0,8%; 1,0%; 2,0%) and lecithin (0,5%;1,0%;2,0%;5,0%;10,0%) on *E. coli*

Padidinus lecitino koncentraciją, *Cymbopogon citratus* antimikrobinės savybės susilpnėja ir *E. coli* bakterijų augimas sustiprėja: kai 0,5% *Cymbopogon citratus* ir 10,0% lecitino bakterijų augimas padidėja (473,9±279,1%). Naudojant *Cymbopogon citratus* 10% ir lecitino 10,0% *E. coli* bakterijų augimas sumažėja (6,03±2,04%).



6 pav. *Cymbopogon citratus* (5,0%; 8,0%; 10,0%; 50,0%) ir lecitino (0,5%; 1,0%; 2,0%; 5,0%; 10,0%) poveikis *E. coli*

Figure 6. Effect of *Cymbopogon citratus* (5,0%; 8,0%; 10,0%; 50,0%) and lecithin (0,5%;1,0%;2,0%; 5,0%; 10,0%) on *E. coli*

IŠVADOS

1. Iš tirtų 100% koncentracijos eterinių aliejų *Eucalyptus globules* (eukaliptų), *Citrus aurantium* (apelsinų), *Citrus paradisi* (greipfrutų), *Picea abies* L. (eglių), *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių), *Mentha piperita* (pipirmėtės), *Thymus vulgaris* (čiobrelių), didžiausią fungistatinę poveikį iš tvirtų oro išskirtiems mikromicetams parodė *Thymus vulgaris* (čiobrelių) eterinis aliejus. Tiriant diskų difuzijos metodu slopinimo zona sudarė 40,0 mm. Panašiu poveikiu pasižymėjo *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) eterinis aliejus, jo slopinimo zona sudarė nuo 27,4±0,55 iki 38±1,0 mm.

2. Minimali fungistatinė *Thymus vulgaris* L (čiobrelių) eterinio aliejaus koncentracija testuojamiems mikromicetams *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*,

Aspergillus oryzae sudarė 0,5% ir 1% *Fusarium moniliforme* ir *Aspergillus fumigatus* mikromicetams.

3. Eterinių aliejų *Mentha piperita* (pipirmėtės) ir *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) minimali fungistatinė koncentracija siekė nuo 4 iki 10% šiems mikromicetams: *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*.

4. Testuojant *Aspergillus niger* ir *E. coli* mikroorganizmus diskų difuzijos metodu su 100% eteriniais aliejais: *Eucalyptus polybretea* (eukaliptų), *Cymbopogon citratus* (citrinžolių), *Citrus decumana* (greipfrutų), *Lavandula officinalis* levandų), *Pinus pumilio* (pušų), *Salvia officinalis* (vaistingųjų šalavijų), *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių), *Mentha arvensis* (mėtų), *Zingibe officinales* (imbierų) slopinimo zona siekė nuo 14,6±4,6 iki 12,8±2,2 mm.

5. Eterinio aliejaus *Zingibe officinales* (imbierų) minimali antimikrobinė koncentracija mikroorganizmams: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* siekė 50%.

6. Eteriniai aliejai *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių), *Cymbopogon citratus* (citrinžolių), *Mentha arvensis* (mėtų) iš tirtų mikroorganizmų (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*) stipriausią antimikrobinį poveikį turėjo *Proteus mirabilis* ($p>0,05$) ir *Candida albicans* ($p>0,48$) mikroorganizmams, minimali slopinanti koncentracija siekė nuo 0,5 iki 0,8%.

7. Eterinių aliejų kombinacijos *Malaleuca alternifolia* ir *Mentha arvensis* turėjo stiprų slopinantį poveikį *P. mirabilis* (MSK=0,02%) ($p>0,05$), *C. albicans* (MSK=0,05%) ($p>0,05$), ir *E. coli* (MSK=0,05%) ($p<0,05$). *Malaleuca alternifolia* ir *Zingibe officinales* slopino augimą: *P. mirabilis* (MSK=0,05%) ($p>0,05$), *C. albicans* (MSK=0,05%) ($p<0,05$), *E. coli* (MSK=0,05%) ($p<0,05$), *St. aureus* (MSK=0,05%) ($p<0,05$).

8. Lecitinas, kaip eterinių aliejų emulgatorius, didina mikroorganizmų augimą bandyme su eteriniu aliejumi *Cymbopogon citratus*.

PASIŪLYMAS

Griežtėjant gyvūnų gerovės reikalavimams vis daugiau dėmesio skiriama gyvūnų aplinkos kokybei gerinimui. Kaip parodė mūsų atlikti tyrimai, eterinius aliejus arba jų kombinacijas galima panaudoti tvirtų oro bioerozolių (mikroorganizmų, dulkių) neigiamam poveikiui sumažinti. Tokius eterinius aliejus kaip *Thymus vulgaris* L. (čiobrelių), *Mentha piperita* (pipirmėčių), *Malaleuca alternifolia* (arbatmedžių) ir *Cymbopogon citratus*

(citrinžolių) galima išpurkšti į tvarų orą, panaudojant šalto rūko generatorius esant gyvuliams ir paukščiams.

DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ MOKSLO DARBŲ SĄRAŠAS

List of publications

1. Mickienė R., Springorum A. C, Bakutis B; Hartung J. Synergistic and antagonistic activity of essential oils – *Malaleuca alternifolia*, *Cymbopogon citratus*, *Mentha arvensis* // Proceedings of the XIV ISAH Congress 2009 International Society for Animal Hygiene. Vechta, Germany. 2009. Volume II. P. 989-992.

2. Mickienė R., Šiugždaitė J, Bakutis B. Eterinių aliejų poveikis mikromicetams, išskirtiems iš paukštynų oro. // Veterinarija ir Zootechnika. 2007. T. 40(62). P. 49-54.

3. Mickienė R., Springorum A. C, Bakutis B; Hartung J. Eterinių aliejų antimikrobinis aktyvumas. // Gyvulininkystė: Mokslo darbai. 2008. 52. P. 73-79.

SUMMARY

Particulates suspended in the air in and emitted from animal housings include dust and of a airborne microorganisms. Airborne microorganism are adsorbed on dust particle smaller than 5 µm in diameter, inhaled by respiration, and deposited in the respiratory tract or lung, which can induce respiratory disorders, such as pneumonia, asthma, bronchitis, and rhinitis. The incidence of these respiratory symptoms and diseases are commonly widespread among farmers working in confinement swine houses that are managed almost in an enclosed condition to keep the pertinent thermal environment constant. Thus, to alleviate the potential for farmers to be exposed to dust and bioaerosols, it is essentially important to control and manage the air quality in the animals houses.

For this reason there exist several methods for air disinfection such as air filtration, air washing or regular water spraying to reduce the concentration of airborne particle. But since the application of disinfectant agents is restricted when living animals may be involved especially in case they are for food production it seems to be necessary to investigate new, eco-friendly, unobjectionable substances with a potential for air-disinfection.

Essential oils (EOs) also called volatile or ethereal oils are aromatic oily liquids obtained from plant material (flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits and roots). They can be obtained by expression, fermentation, enfleurage or extraction but the method of steam distillation is most commonly used for commercial production of EOs. An estimated 3000 EOs are known, of which about 300 are commercially important – destined chiefly for the flavours and fragrances market. It has long been recognised that some EOs have antibacterial properties. Besides antibacterial properties, EOs or their components have been shown to exhibit antiviral, antimycotic, antitoxigenic, antiparasitic, and insecticidal properties.

Aim of the study: To evaluate the antimicrobial effects of essential oils in *vitro* for a possible application to reduce the content of microorganisms in the air of animal farms.

Goals:

I. To evaluate the sensitivity in profile of microorganism strains *in vitro* to some essential oils by using the disk diffusion method.

II. To evaluate the sensitivity in profile of microorganism strains *in vitro* to some essential oils by using the broth dilution method.

III. Determine the antimicrobial activity *in vitro* of some combinations of different essential oils by using the broth dilution method.

IV. To quantify the antibacterial properties of essential oils on a strain of *Escherichia coli* in the presence of an emulsifier.

Novelty and practical application of the study. The complex investigations of essential oils *in vitro* was performed for the first time in Lithuania. Essential oils were selected by their antimicrobial activity against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*) and Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) bacteria, moulds: *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and yeast *Candida albicans*. The assays determine the concentrations required to inhibit growth and reduce microorganisms cells.

The antimicrobial activity *in vitro* of some combinations of essential oils were determined. Interactions among essential oil, bacteria and lecithin were evaluated. Lecithin diminished antibacterial properties.

Practical value of the research – in the experiments of this thesis the most effective essential oils were found, i.e., *Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita*, *Malaleuca alternifolia* and *Cymbopogon citratus*, which possess antimicrobial activity and can be used as a natural biocide for application to reduce the content of microorganisms in the air of animal farms, without emulsifier lecithin.

RESEARCH MATERIALS AND METHODS

The research was carried out in the Institute of Animal Hygiene, Animal Welfare and Behaviour of Farm Animals, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany, and in the Animals Welfare Laboratory of the Food Safety and Animal Hygiene Department at the Lithuanian Veterinary Academy.

In the Animals Welfare Laboratory of the Food Safety and Animal Hygiene Department at the Lithuanian Veterinary Academy the antimicrobial effects of essential oils of the following plants were examined:

Eucalyptus globule, *Citrus aurantium*, *Citrus paradisi*, *Picea abies* L., *Malaleuca alternifolia*, *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris* on specific moulds cultures isolated from air of poultry houses: *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*.

In the microbiological laboratory of the Institute for Animal Hygiene, Animal Welfare and Behaviour of Farm Animals, University of Veterinary Medicine Hannover, the anti-microbial effects of the essential oils of *Eucalyptus polybretea*, *Citrus decumana*, *Cymbopogon citratus*, *Lavandula officinalis*, *Pinus pumilio*, *Salvia officiunalis*, *Malaleuca alternifolia*, *Mentha arvensis*, *Zingibe officinales* were tested on specific bacterial cultures: *Staphylococcus aureus* DSM-No. 799, *Enterococcus faecium*

DSM-No. 2918, *Pseudomonas aeruginosa* DSM-No. 939, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* DSM-No. 788, the yeast *Candida albicans* DSM-No. 1386 and on the mould *Aspergillus niger*.

Essential oils. Essential oils of *Eucalyptus globules* (*eucalyptus*), *Eucalyptus polybretea* (*eucalyptus*), *Cymbopogon citratus* (lemongrass), *Citrus decumana* (grapefruit), *Citrus aurantium* (orange), *Citrus paradisi* (grapefruit), *Lavandula officinalis* (lavender), *Picea abies* L. (spruce), *Pinus pumilio* (pine), *Salvia officiunalis* (sage), *Malaleuca alternifolia* (tea tree), *Mentha piperita* (peppermint), *Mentha arvensis* (mint), *Thymus vulgaris* (thyme), *Zingibe officinales* (ginger), was obtained from a commercial source (Oil manufacturer Sensient Essential Oils, GmgH, Germany).

Moulds species. Animals houses environmental origin: *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. These moulds were isolated from air of animals houses, apply sedimentation method to R. Koch. Strains were analysed by light microscopy and identified according to Domsch et al., 1980; Ellis, 1976; Gams, 1971; Lugauskas ir kt., 2002; Nelson et al., 1983; Ramirez, 1982; Samson and Van Reenen-Hoekestra, 1988.

Essential oils determination of the antimould activity by disc diffusion assay. Mould suspension of 1ml (according to 0,5 Mc Farland turbidity standards) prepared with sterile 0,85% physiological saline solution. Standardised microorganism suspension of 1 ml was uniformly spread on the sterile Czapek's agar in Petri dishes. Filter paper discs were used for antimould activity of essential oils. Sterile filter paper discs (6mm) were soaked with 10 µl of each essential oil and placed on the center of Czapek's agar in Petri dishes inoculated with the mould suspension. The incubation time was 7-10 days at 25°C. At the end of the incubation period, the inhibition halo diameters were measured using calipers and expressed in millimeters. When the inhibition halo observed was equal or higher than 10 mm diameter, it was considered as a positive antimould activity (Lima et al., 1993).

Essential oils determination of the minimum inhibitory concentration. Essential oils that presented antimould activity and showed inhibition halo equal or higher than 10 mm diameter were evaluated for their MIC determination and it was carried out by the plate diffusion procedure using wells in dishes (Hadacek and Greger, 2000). The concentration able to develop inhibition halos equal or higher than 10mm diameter was considered as MIC.

Microorganisms species. This study used two Gram + (*Staphylococcus aureus* DSM-No. 799, *Enterococcus faecium* DSM-No. 2918), three Gram –

(*Pseudomonas aeruginosa* DSM-No. 939, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* DSM-No. 788) species and the yeast *Candida albicans* DSM-No. 1386. Microorganisms species were obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Germany).

Essential oils determination of the antimicrobial activity by disc diffusion assay. The microorganisms were cultivated on Bloodagar-Base N. 2 and on DG-18 respectively for the mould. One colony of each microorganism was picked and diluted in sterile peptone-water (PW) with reference to the McFarland standard to achieve an inoculum of approximately 10^5 - 10^6 colony-forming units per ml (CFUml⁻¹). 50 µl of this inoculum was uniformly plated onto the surface of Bloodagar-Base N. 2 (bacteria), Malt Extract Agar (yeast) and DG-18 (moulds) in Petri dishes. After one minute, sterile 6 mm diameter paper discs were placed on the plates and immediately immersed with 10µl portions of the 100% concentration essential oils. Sterile PW was used as control. After allowing the essential oils to diffuse across the surface for 1h at room temperature, the plates with bacteria were incubated at 37°C for 24 h. Moulds were cultivated on DG-18 at 25°C for 7–10 days. At the end of the incubation period, the inhibition halo diameters were measured and expressed in millimetres (Lima et al., 1993).

Determination of the minimum inhibitory concentration by broth dilution assay. The broth dilution method was used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2001).

The MIC is defined as the lowest concentration of the essential oil at which the microorganism does not demonstrate visible growth.

Emulsification of essential oils. The antimicrobial activity was further tested using soy lecithin with a view to stabilizing the essential oil in the broth and thereby improving the antibacterial properties. Set up as follows: 50 µl of *Escherichia coli* suspension and 50 µl of peptone water-essential oil (concentrations - 0,5-50%)–lecithin (concentrations - 0,5-10%) suspension were placed in sterile individual microplate wells and incubated at 37°C for 24 h. Then, 100 µl of microorganism- peptone water- essential oil-lecithin suspension dissolved in tubes with 0,02% Tween 80. 100 µl of aliquots suspension was plated onto Blood Agar Base N. 2 agar plates and incubated at 37°C for 24h. After incubation, colonies were counted.

Essential oils in various combinations determination of the minimum inhibitory concentration by broth dilution assay. The broth dilution method was used to investigate synergism between the essential oils: *Malaleuca alternifolia* and *Mentha arvensis*, *Malaleuca alternifolia* and *Cymbopogon citratus*, *Malaleuca alternifolia* and *Zingibe officinales*,

Cymbopogon citratus and *Mentha arvensis*, *Cymbopogon citratus* and *Zingibe officinales*.

All tests were performed in peptone water. A dilution of the essentials oils was prepared in the concentration range of 0,01-50%, including one growth control (peptone water + microorganism) and one sterility control.

Statistical analysis. The data were analysed using the “SPSS for Windows”, version 12,0 and “Microsoft Office Excel 2003” calculating the mean of values (X), standard deviation (Sx), coefficient of variation (CV). The P- value of 0,05 was set as a limit for statistically significant difference in the studies.

RESULTS

CHAPTER I. The effect of essential oils on moulds species isolated from animals houses. Most of the oils evaluated exhibited significant inhibitory activity against all seven of the mould species tested. The results show the wide variation in the antimicrobial properties of plant essential oils. The oil of *Picea abies* L. showed no or very slight inhibition. Essential oil from *Picea abies* L. did not present any activity on the moulds *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus versicolor*. Though volatile compounds of *Picea Abies* L. oil produced inhibition zones of 10 mm in *Cladosporium herbarum* mould strain cultures.

Identic, very slight inhibitory activity presented *Citrus paradisi* essential oil. In the plates with *Paecilomyces variotii* and *Cladosporium herbarum* strains the radius of inhibition was between 8,4±0,6 and 10,20±0,8 mm. *Citrus paradisi* presented slight activity on the *Asergillus* species. The results from test with *Aspergillus* spp. were between 1,4±0,6 and 5,0±0,7 mpm.

The strongest antimicrobial effect exhibited *Malaleuca alternifolia*, *Citrus aurantium* and *Eucalyptus globulus* – sterile filter paper discs soaked with of each essential oil presented inhibition halos between 10,6±0,6 and 38,0±1,0 mm. *Malaleuca alternifolia* presented high antifungal activity against *Cladosporium herbarum* and the inhibition halo was equal 38,0±1,0 mm. A low inhibition halo (27,4±0,6mm) presented *Aspergillus niger*. Essential oils *Citrus aurantium* and *Eucalyptus globulus* presented low antifungal activity compare with *Malaleuca alternifolia*. *Mentha piperita* and *Thymus vulgaris* L. essential oils show the strongest activity. They essential oils have strong effect against all seven moulds strains, and inhibition halo was 40,0±0,0 mm. Essential oils - *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris* L., *Malaleuca alternifolia* that presented strong antimould activity in the screening assay were evaluated for their MIC determination. *Thymus vulgaris* L. presented best results in the MIC assay for *Aspergillus oryzae*,

Aspergillus versicolor, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Paecilomyces variotii*. *Thymus vulgaris* L. presented a MIC of 0,5% for *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, and the inhibition halo was equal 10 mm. High concentration (1,0%) of essential oil *Thymus vulgaris* L. need for *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium moniliforme*.

MIC values of *Mentha piperita* for the fungi species are ranging between 4,0 and 10,0%. In the plates with *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus oryzae* MIC values - 4,0%, for *Aspergillus versicolor*, *Fusarium moniliforme* – 8,0%, *Aspergillus niger* – 10,0%.

Essential oil from *Malaleuca alternifolia* showing MIC values (10,0%) against *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium moniliforme* and in plates with *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum* the MIC was 8%.

CHAPTER II. Sensitivity of microorganisms to some essential oils by broth dilution. The essential oils that exhibit the greatest antibacterial effect in the disc diffusion assay *Cymbopogon citratus*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha arvensis* and one EOs *Zingibe officinales* which presented low antimicrobial activity in the disc diffusion assay were further tested using a broth dilution technique. The results show the wide variation in the antimicrobial properties of plant essential oils. The result showed that *Zingibe officinales* as inhibitory concentration equal 0,5% were most active against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* - and percentage of growing bacteria were *St. aureus* 20±17,8% (p>0,05), *P. aeruginosa* 40±24,6% (p>0,05), *P. mirabilis* 23,44±5,9% (p<0,05). From antibacterial test with *E. coli*, *C. albicans* and *E. faecium* result were similar – inhibition percent low and percentage of growing bacteria *E. coli* grow 91,6±15,3 (p<0,05), *C. albicans* 86,5±14,7 (p<0,05) and *E. faecium* 80,7±17,7 (p<0,05).

Only high doses of *Zingibe officinales* essential oil were able to stop bacterial growth. *Zingibe officinales* at 50,0% completely inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and yeast *Candida albicans* amount.

Escherichia coli demonstrated different responses to *Zingibe officinales*, which can probably be attributed to their different membrane structures. That the essential oil molecules attach to bacterial cell membrane structures, causing a breakdown in membrane permeability properties and an increased susceptibility to essential oils.

Mentha arvensis had more antimicrobial activity for all the

microorganism species than *Zingibe officinales*. A concentration of 2% was already sufficient to inhibit *St. aureus* and *E. coli*. Minimal bactericidal concentration of *Mentha arvensis* essential oil to inhibit growth of all the four bacteria, *E. coli* (5,6±5,6) (p>0,05), *E. faecium* (50,9±17,7) (p<0,05), *St. aureus* (1,19±1,6) (p>0,05), *P. aeruginosa* (38,9±24,5) (p>0,05), was 50,0%.

Essential oils having menthol as the major component exhibited most potent activity against *P. mirabilis*, *C. albicans* and strong antimicrobial activity against *E. coli* and *St. aureus*.

The *P. mirabilis* and *C. albicans* were much more sensitive to the *Mentha arvensis* essential oil and minimal bactericidal concentration for this two germs needed was 0,8%. At a concentration of 0,1%, *P. mirabilis* (29,5±18,0) (p>0,05), *C. albicans* (69,6±32,4) (p<0,05) were still growing.

Malaleuca alternifolia showed activity against *E. coli* comparable to essential oil *Zingibe officinales* and strong antimicrobial activity against *P. mirabilis*, *C. albicans*. The inhibitory effects of *Malaleuca alternifolia* oil were different on *P. mirabilis*, *C. albicans* and *E. coli*, *E. faecium*, *P. aeruginosa*, *St. aureus*. MIC for *P. mirabilis*, *C. albicans* was 0,5% *Malaleuca alternifolia* oil. At a concentration of 0,1% essential oil the growth rate of the two bacteria was still (4,4±3,4%) (*P. mirabilis*, p>0,05) and (14,4±11,4%) (*C. albicans*, p>0,05).

Malaleuca alternifolia oil was already sufficient to inhibit the growths of all the four bacteria strains at a concentration of 5%. When applying 0,5% *Malaleuca alternifolia* oil growth rates of the bacteria were (26,14±19%) (*P. aeruginosa*, p>0,05), (24±17,6%) (*E. faecium*, p>0,05), (1,18±2,19%) (*St. aureus*, p>0,05) and (0,014±0,026%) (*E. coli*, p>0,05).

Major components geraniol and nerol, were active against the four tested organisms *P. mirabilis*, *C. albicans*, *St. aureus*, *E. coli*.

Cymbopogon Citratus oil is considerably potent against *P. mirabilis* and *C. albicans*. Growth rate at 0,1% oil concentration was already reduced to (4,39±3,36%) (*P. mirabilis*, p>0,05) and (14,4±11,4%) (*C. albicans* p>0,48). A full growth inhibition with *Cymbopogon Citratus* oil is reached for *C. albicans* and *P. mirabilis* at a concentration of 0,5%.

Cymbopogon Citratus was able to exert antimicrobial activity on *E. coli*, *E. faecium*, *P. aeruginosa*, *St. aureus* up to 0,5% concentration: *E. coli* (0,008±0,009%) (p>0,05), *E. faecium* (13,7±12,96%) (p>0,05); *P. aeruginosa* (25,6±19,9%) (p>0,05), *St. aureus* (0,77±1,2%) (p>0,05). The bacteria growth was completely inhibited by *Cymbopogon Citratus* used for *E. faecium* and *P. aeruginosa* at a 5,0%, *E. coli* 0,8%, *St. aureus* 8,0%.

Combined effects of essential oils. The concentration 0,005% of *Malaleuca alternifolia* combined with *Cymbopogon Citratus* remarkably

decreased the growth of *St. aureus* (84,32±15,23) ($p<0,05$), *P. mirabilis* (88,2±3,49) ($p<0,05$), *C. albicans* (74,02±21,81) ($p<0,05$) and *E. coli* (89,38±8,53) ($p<0,05$). The MBC found for this four bacteria was 0,05%.

The inhibitory effects of *Malaleuca alternifolia* combined with *Cymbopogon Citratus* (MaCc) were different on *P. aeruginosa* and *E. faecium*. MIC of MaCc on *P. aeruginosa* was 5,0% and 8,0% when applied on *E. faecium*.

Cymbopogon Citratus and *Zingibe officinales* (CcZo) presented similar activity to MaCc for *St. aureus*, *P. mirabilis*, *C. albicans*, *E. coli* (MBC=0,05%). As used concentration CcZo 0,005% percent of growing bacteria *St. aureus* (82,22±8,96) ($p<0,05$); *P. mirabilis* (94±3,08) ($p<0,05$); *C. albicans* (62,68±22,18) ($p<0,05$); *E. coli* (97,24±2,98) ($p<0,05$).

Combination of CcZo presented a low antimicrobial activity against two of the microorganisms - minimal bactericidal concentration against *P. aeruginosa* at a 8%, against *E. faecium* at a 50,0%.

Percent of growing bacteria as used 0,5% CcZo is *P. aeruginosa* (23,06±6,24) ($p<0,05$) and *E. faecium* (0,6±0,54) ($p<0,05$).

Malaleuca alternifolia and *Mentha arvensis* (MaMe) presented strong inhibitory effect of *P. mirabilis* (MIC=0,02%), *C. albicans* and *E. coli* (MIC=0,05%) and percent of growing bacteria is very low – as used 0,01% concentration of MaMe, *C. albicans* growth (0,07±0,04) ($p>0,05$), *P. mirabilis* growth (0,26±0,15) ($p>0,05$), *E. coli* growth (0,44±0,15) ($p<0,05$).

The bacteria *E. faecium* and *Ps. aeruginosa* was less sensitive and percent of growing bacteria as used 0,5% MaMe for *E. faecium* (1,13±0,45) ($p<0,05$) and *Ps. aeruginosa* (40,14±13,81) ($p<0,05$). MaMe presented MBC values for *E. faecium* 8,0%, *Ps. aeruginosa* and *St. aureus* need lowest MIC values=5,0%. *St. aureus* showing high activity of MaMe. MBC=5,0%, but percent growing bacteria as used 0,5% MaMe are very small (0,022±0,008) ($p<0,05$).

Malaleuca alternifolia and *Zingibe officinales* (MaZo) presented strong inhibitory activity. As used (0,01%) of MaZo percent of growing bacteria was for *P. mirabilis* at (0,54±0,38) ($p>0,05$), *C. albicans* (0,048±0,004) ($p<0,05$), *E. coli* (0,26±0,11) ($p<0,05$), *St. aureus* (0,15±0,05) ($p<0,05$). Minimum bactericidal concentration for this four bacteria containing 0,05% of MaZo.

The MaZo exhibited alike minimal bacteriocidal activity against *Ps. aeruginosa* and *E. faecium* (MBC=8,0%), but *E. faecium* as concentration MaZo 0,5% inhibit strongly growth *E. faecium*. Procentage of growing bacteria *E. faecium* (1,06±0,52) ($p>0,05$), *Ps. aeruginosa* (23,3±3,9) ($p<0,05$).

The *Cymbopogon citratus* and *Mentha arvensis* (CcMa) for *St. aureus*,

P. mirabilis, *C. albicans* and *E. coli* presented the same minimal bactericidal concentration (MIC=0,5%). In the concentration 0,005% CcMa bacteria grow *St. aureus* (90,16±8,6) ($p<0,05$), *P. mirabilis* (92,4±4,09) ($p<0,05$), *C. albicans* (76,48±19,36) ($p<0,05$), *St. aureus* (90,16±8,5) ($p<0,05$), *E. coli* (97,06±2,09) ($p<0,05$). The low sensitive species are *Ps. aeruginosa* and *E. faecium*. For *Ps. aeruginosa* MBC value was 8,0%. *E. faecium* has the highest MIC value 10%. CcMa 0,5% presented inhibition for *Ps. aeruginosa* (34,6±8,8) ($p<0,05$) and *E. faecium* (0,82±0,74) ($p>0,05$).

Antibacterial activity of essential oil in the presence of lecithin. After the addition of lecithin range 0,5-10,0% and various concentration (0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 5,0; 8,0; 10,0; 50,0%) *Cymbopogon citratus* antimicrobial effect was very low on the *Escherichia coli*. The addition of the *Cymbopogon citratus* 0,5% and lecithin 1,0%, *E. coli* grow (7,8±0,6%). As used high concentration lecithin and small *Cymbopogon citratus* this combination did not show antibacterial activity contrary *E. coli* grow highest percentage. As used combination *Cymbopogon citratus* 0,5% and lecithin 10,0% bacteria grow very well (473,9±279,1%). As used high percentage *Cymbopogon citratus* in combination with lecithin in this case showed antibacterial inhibition. Combination *Cymbopogon citratus* 10,0% and lecithin 10,0% showed 6,03±2,04% inhibition.

CONCLUSIONS

1. As used 100% concentration essential oils: *Eucalyptus globules* (*eucalyptus*), *Citrus aurantium* (orange), *Citrus paradisi* (grapefruit), *Picea abies* L. (spruce), *Malaleuca alternifolia* (tea tree), *Mentha piperita* (peppermint), *Thymus vulgaris* (thyme), in disc diffusion assay - *Thymus vulgaris* presented strong antifungal effect 40,0mm medium values of the inhibition halo against mould species from animals houses. Similar strong antifungal effect presented essential oil – *Malaleuca alternifolia* (tea tree) – inhibition halo was observed 27,4±0,55 to 38±1,0mm.

2. Essential oil *Thymus vulgaris* L. (thyme), presented minimal fungistatic concentration for moulds species *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* 0,5% and for moulds *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus fumigatus* MFC=1%.

3. Essential oils *Mentha piperita* (peppermint), and *Malaleuca alternifolia* (tea tree) make MIC=4 to 10% on moulds species isolated from animals houses: *Paecilomyces variotii*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*.

4. In disc diffusion assay as used 100% concentration essential oils (*Eucalyptus polybretea* (eucalyptus), *Cymbopogon citratus* (lemongrass), *Citrus decumana* (grapefruit), *Lavandula officinalis* (lavender), *Pinus pumilio* (pine), *Salvia officinalis* (sage), *Malaleuca alternifolia* (tea tree), *Mentha arvensis* (mint), *Zingibe officinales* (ginger) and microorganisms *Aspergillus niger* and *E. coli* more potent antimicrobial activity presented *Cymbopogon citratus*, *Malaleuca alternifolia*, *Mentha arvensis* and inhibition halos was observed from 14,6±4,6 to 12,8±2,2 mm.

5. Essential oil *Zingibe officinales* presented MIC=50,0% against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and yeast *Candida albicans* amount.

6. In broth solution assay *Malaleuca alternifolia*, *Cymbopogon citratus* and *Mentha arvensis* from microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, presented strong activity against *P. mirabilis* and *C. albicans* MIC=0,5 to 0,8%.

7. Essential oil combinations *Malaleuca alternifolia* and *Mentha arvensis* presented strongest inhibitory effect of *P. mirabilis* (MIC=0,02%) ($p>0,05$), *C. albicans* (MIC=0,05%) ($p>0,05$), and *E. coli* (MIC=0,05%) ($p<0,05$). *Malaleuca alternifolia* and *Zingibe officinales* inhibited the growth of: *P. mirabilis* (MIC=0,05%) ($p>0,05$), *C. albicans* (MIC=0,05%) ($p<0,05$), *E. coli* (MIC=0,05%) ($p<0,05$), *St. aureus* (MIC=0,05%) ($p<0,05$).

8. Lecithin as an emulsifier seems to be dispensable and counterproductive since it reduced the antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* oil.

RECOMMENDATION

Strong requirements on animal welfare are increasingly focused on improving the environmental quality of the animals. As demonstrated in our studies, essential oils or their combinations can be used for to reduce the negative impacts of bioaerosols (micro-organisms, dust) in air of animal houses. The most effective essential oils *Thymus vulgaris* L. (thyme), *Mentha piperita* (peppermint), *Malaleuca alternifolia* (tea tree) ir *Cymbopogon citratus* (lemongrass) can be sprayed with cold fog generator into the animal houses.

ŽINIOS APIE AUTORE

RŪTA MICKIENĖ gimė 1977 m. birželio 18 d. Kaune.

1983–1994 mokėsi Kauno 13 vidurinėje mokykloje. 1994 m. įstojo į Lietuvos veterinarijos akademiją, kurią 1999 m. baigė įgydama veterinarijos gydytojos kvalifikaciją.

1999 m. dirbo Kauno m. VMVT veterinarijos gydytojos pareigose.

1999–2004 m. dirbo UAB „Fitoveta“ farmacininkės pareigose.

2004–2005 m. LVA Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedroje vyr. laborantės pareigose.

2004 metais įstojo į doktorantūrą Lietuvos veterinarijos akademijos Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedroje. Doktorantūros studijų metais pagal SOCRATES/ERAZMUS programą atliko mokslinius tyrimus Vokietijos Hanoverio Hanoverio veterinarinės medicinos universitete Gyvūnų higienos, gerovės ir elgsenos institute pas prof. J. Hartungą, paskelbė 3 mokslinius straipsnius, dalyvavo 3 tarptautinėse ir 1 respublikinėje konferencijose.

Maketavo R. Trainienė

Už teksto turinį ir redagavimą atsakingas autorius

Spausdino LVA Spaudos ir leidybos skyrius

Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas

Tiražas 50. _____ sp.l. Užs. Nr. _____. 2009