



Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8707
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 619:614.3.7:636.4

The study of essential oil on antimicrobial activity and their composition towards microorganism

V.L. Kovalenko¹, O.O. Napnenko¹, I. Chornyi², A.V. Zagrebelnyi³

¹State Scientific Control Institute Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

²State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamyanets-Podilskyi, Ukraine

³State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 05.02.2018
Received in revised form
09.03.2018
Accepted 16.03.2018

State Scientific Control Institute
Biotechnology and Strains of
Microorganisms, Donetska str., 30,
Kyiv, 03151, Ukraine.
Tel.: +38-044-245-76-08
E-mail: admin@biocontrol.com.ua

State Agrarian and Engineering
University in Podilya,
T. Shevchenko Str., 13, Kamyanets-
Podilskyi, 32316, Ukraine.
Tel.: +38-038-496-83-22
E-mail: dekan-vet@pdatu.edu.ua

State Scientific and Research
Institute of Laboratory Diagnostics
and Veterinary and Sanitary
Expertise, Donetska str., 30, Kyiv,
03151, Ukraine.
Tel.: +380 (44) 243-37-54
E-mail:
dndildvse@vetlabresearch.gov.ua

Kovalenko, V.L., Napnenko, O.O., Chornyi, I., & Zagrebelnyi, A.V. (2018). The study of essential oil on antimicrobial activity and their composition towards microorganism. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(87), 38–41. doi: 10.15421/nvlvet8707

In the course of the research, the microorganisms that often caused disease for animals were used, according to the literature, were genetically predisposed to resistance to traditional antibiotics and needed to find new effective means to combat them. It was used different antibiotic substances benzalkonium chloride, silver nanoparticles, and promising in this direction, essential oils of plants: fir, eucalyptus. The article provides information on the selection and study of the efficacy of substances, components with essential oils necessary for the development of complex bactericidal agents and the study of their antimicrobial activity against microorganisms. In determining the antimicrobial activity of essential oils, test cultures were used: *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Micrococcus lisogenicus*, *B. subtilis* AATCC6633, *B.cereus* ATCC6633, *S. aureus* 209-P, *S. zooepidemicus*, *Clebsiella* spp, *Salmonella cholerae suis*, *Pasteurella multocida* from the museum of State Scientific and Control Institute of Biotechnology and strains of microorganisms. The determination of fungicidal activity was performed on microscopic molds of *Penicillium citrinum*, *Penicillium urticae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*. In experiments with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pasteurella multocida*, the antibiotic action of essential oils of eucalyptus and puff was confirmed and the possibility of its enhancement by the addition of quaternary ammonium compounds was confirmed. According to the results, the use as an alternative to antibiotics and disinfectants of preparations based on vegetable essential oils in the form of aerosols not only improves the number of animals from respiratory infections of bacterial origin, but also significantly improves the ecological conditions of the work of personnel in livestock buildings, promotes treatment and prevention respiratory diseases. The investigations have proved the expediency of using vegetable essential oils for the design of highly effective drugs and the possibility of enhancing their antimicrobial activity by quaternary ammonium compounds and silver nanoparticles, as well as a complex preparation «Asept» for aerosol application in the presence of animals.

Key words: essential oils, microorganisms, benzalkonium chloride, nanoparticles, bactericidal agent.

Вивчення антимікробної активності ефірних олій та їх композицій до мікроорганізмів

В.Л. Коваленко¹, О.О. Напненко¹, І.О. Чорний², О.В. Загребельний³

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ, Україна

²Подільський державний аграрно-технічний університет, м. Кам'янець-Подільський, Україна

³Державний НДІ з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна

При проведенні досліджень використовували мікроорганізми, які найчастіше спричиняли захворювання тварин, були, за даними літератури, генетично схильними до набуття резистентності до традиційних антибіотичних речовин та потребували пошуку нових ефективних засобів для боротьби з ними. В роботі використовували як різні антибіотичні субстанції бензалконія хлорид, наночастинки срібла, так і перспективні в цьому напрямку ефірні олії рослин: піхти, евкаліпту. У статті наведена інформація

щодо підбору та вивчення ефективності субстанцій, компонентів з ефірними оліями, необхідних для розробки комплексних бактерицидних засобів та вивчення їх антимікробної активності до мікроорганізмів. При визначенні антимікробної активності ефірних олій використовували тест-культури: *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Micrococcus lisogenicus*, *B. subtilis* AATCC6633, *V. cereus* ATCC6633, *S. aureus* 209-P, *S. zooepidemicus*, *Clebsiella* spp, *Salmonella cholerae suis*, *Pasteurella multocida* з музею Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Визначення фунгіцидної активності проводили на мікроскопічних плісневих грибах *Penicillium citrinum*, *Penicillium urticae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*. В досліді з тест-мікроорганізмами *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pasteurella multocida* підтверджена антибіотична дія ефірних олій евкالیпту і піхти та підтверджено можливість її підсилення додаванням четвертинних амонійних сполук. У відповідності до результатів, застосування як альтернативи антибіотикам та дезінфікуючим засобам препаратів на основі рослинних ефірних олій у вигляді аерозолів не тільки оздоровлює поголів'я тварин від респіраторних інфекцій бактеріального походження, але й значно покращує екологічні умови роботи персоналу в тваринницьких приміщеннях, сприяє лікуванню та попередженню захворювання дихальних шляхів. Дслідженнями доведено доцільність використання рослинних ефірних олій для конструювання високоєфективних препаратів та можливість підсилення їх антимікробної активності четвертинними амонійними сполуками та наночастинками срібла, а також запропоновано комплексний препарат «Асепт» для аерозольного застосування в присутності тварин.

Ключові слова: ефірні олії, мікроорганізми, бензалконія хлорид, наночастинки, бактерицидний засіб.

Вступ

Найбільші збитки тваринницькі господарства несуть від захворювань, що супроводжуються ураженням дихальної та шлунково-кишкової системи. В більшості випадків в їхній основі лежать інфекційні захворювання переважно бактерійного походження. Водночас існує багато факторів як біотичних, так і абіотичних, які виступають пусковим механізмом та значно впливають на подальший розвиток цих захворювань, а також ефективність методів та засобів їх профілактики і лікування (Kurtyak et al., 2017; Boiko et al., 2017; Levkivska et al., 2017; Kysera et al., 2018; Gutuj et al., 2018).

Причинами захворювань тварин можуть бути також порушення технологічного процесу та навіть людський фактор. Всі ці причини та фактори, що сприяють розвитку інфекційного процесу, призводять до функціональних порушень організму тварин та до розвитку інфекційних захворювань, ефективно боротись із якими можна лише одночасним впливом на всі ланки технологічного процесу. Таким чином, проблеми профілактики і ліквідації бактеріальних захворювань тварин в промислових господарствах необхідно вирішувати в комплексі з вирішенням інших технологічних питань щодо утримання та годівлі тварин (Lorian, 1996; Hanaki and Hiramatsu, 2001; Homzykov, 2006; Vasilyeva, 2016).

Мета роботи: підбір та вивчення ефективності субстанцій, компонентів, необхідних для розробки комплексних антибактерійних засобів та вивчення їхньої антимікробної активності до мікроорганізмів.

При проведенні досліджень використовували мікроорганізми, які найчастіше спричиняли захворювання тварин, були, за даними літератури, генетично схильними до набуття резистентності до традиційних антибіотичних речовин та потребували пошуку нових ефективних засобів для боротьби з ними (Weidemann, 1998; Kovalenko and Nedosiekov, 2011).

Матеріал та методи досліджень

У роботі використовували як різні антибіотичні субстанції бензалконія хлорид, наночастинки срібла, так і перспективні в цьому напрямку ефірні олії рослин: піхти, евкالیпта. Застосовували поживні середовища: МПАХ, МПА, МПБХ, МПБ, середовище Сабу-

ро, тіогліколеве середовище. Всі середовища готували згідно з настановами або за загальноприйнятими методиками та стерилізували автоклавуванням (при температурі 118 °С – 60 хвилин).

При вивченні антибіотичної активності ефірних олій методом дифузії в агар враховували особливості їх дифундування, які обумовлені їхніми ліпофільними компонентами, і можливими зменшеннями зон затримки росту на агарі порівняно з хімічними засобами. Дослідження антимікробної активності ефірних олій проводили із застосуванням модифікованих з урахуванням нерозчинності ефірних олій в воді методів, а саме: методу макророзведень в поживному середовищі з подальшим культивуванням в умовах, оптимальних для мікроорганізмів; методу дифузії в агар із застосуванням паперових дисків, просочених певними концентраціями ефірних олій.

Вивчення мінімально діючих кількостей та концентрацій рослинних ефірних олій на тестові мікроорганізми та деякі патогенні ізоляти проводили за застосування методу дифузії з урахуванням особливості поширення ефірних олій, які обумовлені їх ліпофільними компонентами, тому зони затримки росту на агарі будуть значно меншими, ніж при застосуванні водорозчинних антибіотичних речовин та хімічних дезінфектантів.

При визначенні антимікробної активності ефірних олій використовували тест-культури: *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Micrococcus lisogenicus*, *B. subtilis* AATCC6633, *V. cereus* ATCC6633, *S. aureus* 209-P, *S. zooepidemicus*, *Clebsiella* spp, *Salmonella cholerae suis*, *Pasteurella multocida* з музею Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Визначення фунгіцидної активності проводили на мікроскопічних плісневих грибах *Penicillium citrinum*, *Penicillium urticae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*.

Бактерицидну дію 2 ефірних олій та їх суміші вивчали в 3 серіях дослідів із застосуванням тест-об'єктів. Тест-об'єкти (10×10см) інфікували суспензією однодобової агарової культури *E. coli* (шт. 1257) і *S. aureus* (шт. 209-P) з розрахунку 2 млрд мікробних клітин в 1 см³ суспензії культур, приготовлених відповідно до оптичного стандарту МакФарланда на 100 см² поверхні. В контрольних досліді аналогічно інфіковані тест-об'єкти зрошували фізіологічним розчином. У кожному досліді використовували не

менш трьох тест-об'єктів. Ефірні олії наносили на тест-об'єкти в концентраціях 1:4000 – 1:8000.

Після закінчення відповідної експозиції з контрольних і дослідних тест-об'єктів брали змиви стерильними марлевими тампонами, які вміщували в пробірки з нейтралізатором. Змиви досліджували за загальноприйнятною методикою (відмивання центрифугуванням, висівом центрифугату на 50% сахарозний МПБ з пересівом через 24 години, інкубування в термостаті при температурі 37 °С, для виділення *E. coli* використовували середовище Ендо, та 8,5% сольовий МПА для індикації *S. aureus*).

Ефективність знезаражування визначали за наявністю або відсутністю росту тест-культур на живильних середовищах при інкубації посівів у термостаті при 37 °С через 48 годин і 7 діб (Lorian, 1996; Hanaki and Hiramatsu, 2001; Homzykov, 2006).

Результати та їх обговорення

Результати дослідів з визначення антимікробної активності ефірних олій рослин (піхтової та евкалиптової) та в поєднанні їх з підсилювачами антимікробної дії – четвертинними амонійними сполуками та наночастинками срібла до мікроорганізмів *Staphylo-*

coccus aureus, *Streptococcus spp*, *Pasteurella multocida*. Результати досліджень викладені в таблиці 1.

Отримані дані свідчать про високу антимікробну активність ефірних олій евкаліпта та піхти та особливо їхніх сумішей з бензалконієм хлоридом. Додавання наночастинок срібла значно підвищує антибіотичну дію розчинів ефірних олій. При застосуванні чистих ефірних олій та сумішей ефірних олій спостерігали пригнічення росту культур тестових мікроорганізмів *Streptococcus zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus*, *Pasterella multocida*, а при застосуванні тих же сумішей із додаванням бензалконія хлориду та наночастинок срібла – значно підсилювалась антимікробна дія.

При вивченні мінімально діючих кількостей та концентрацій рослинних ефірних олій на тестові мікроорганізми та деякі патогенні ізоляти методом дифузії в агар, при нанесенні на паперові диски 0,1–0,3 мл ефірних олій встановлювали зони затримки росту досліджуваних культур, що перебували в межах 14–70 мм. За ефективністю антибактеріальної дії ефірні олії визначились таким порядком: піхта, евкаліпт.

Результати досліджень (табл. 2–3) вказують на високу антибактеріальну активність ефірних олій у відношенні до тест-мікроорганізмів.

Таблиця 1

Результати вивчення антимікробної дії ефірних олій та композицій на тестові мікроорганізми *Streptococcus zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*

Розчини (зависі) ефірних олій та їхні суміші в МПБ (0,05 мл на диск)	Діаметр зон затримки росту (мм)		
	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
Бензалконіум хлорид (0,1%)	19 ± 3	22 ± 2	19 ± 2
Піхтова ефірна олія	22 ± 2	21 ± 3	15 ± 1
Евкалиптова ефірна олія	15 ± 1	13 ± 1	18 ± 2
Суміш ефірних олій з додаванням бензалконіуму хлориду	25 ± 3	29 ± 2	26 ± 3
Суміш ефірних олій з додаванням бензалконіуму хлориду та наночастинок срібла	33 ± 2	35 ± 3	36 ± 1
Контроль	Суцільний ріст	Суцільний ріст	Суцільний ріст

Таблиця 2

Результати вивчення дії ефірних олій на тест-мікроорганізми

Ефірні олії (100 мл на диск)	Діаметр зон затримки росту бактерій (мм)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>M. luteus</i> ATCC9341	<i>S. aureus</i> P 209
Евкалипту	19	17	23	21	22
Піхти	17	19	18	19	21

Таблиця 3

Результати вивчення дії ефірних олій на польові патогенні ізоляти бактерій

Мікроорганізми	Діаметр зон затримки росту бактерій (мм) при нанесенні на диски ефірних олій (мкл)				
	Піхти		Евкалипту		
	100	50	100	50	50
<i>E. coli</i>	0	0	31	12	
<i>Salmonella cholerae suis</i>	0	0	27	9	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	33	18	
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	19	11	41	23	
<i>Pasteurella multocida</i>	27	18	23	11	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	
<i>Clostridium perfringens</i>	17	9	0	0	

При внесенні ефірних олій в живильні середовища у співвідношеннях 1:10 – 1:200 проявляється різний ступінь антибактерійної дії до досліджуваних бактеріальних культур. За ефективністю фунгіцидної дії ефірні олії визначались наступним порядком: піхта, евкаліпт.

Зони затримки росту мікроскопічних пліснявих грибів (при нанесенні на паперові диски 0,1–0,3 мл ефірних олій) знаходились в межах 20–50 мм. Додатково відмічались зміна кольору грибних культур від центру до країв чашки Петрі. При внесенні ефірних олій в живильні середовища з пліснявими грибами – в співвідношеннях 1:10 – 1:100 проявляється фунгіцидна дія від пригнічення (поодинокі колонії, зміна кольору грибів, відсутність повітряного міцелію).

Висновки

В дослідях з тест-мікроорганізмами *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pasteurella multocida* підтверджена антибіотична дія ефірних олій евкаліпту і піхти та підтверджено можливість її підсилення додаванням четвертинних амонійних сполук.

Відповідно до результатів, застосування як альтернативи антибіотикам та дезінфікуючим засобам препаратів на основі рослинних ефірних олій у вигляді аерозолів не тільки оздоровлює поголів'я тварин від респіраторних інфекцій бактеріального походження, а й значно поліпшує екологічні умови роботи персоналу в тваринницьких приміщеннях, сприяє лікуванню та запобіганню захворювання дихальних шляхів.

Дслідженнями доведено доцільність використання рослинних ефірних олій для конструювання високоєфективних препаратів та можливість підсилення їх антимікробної активності четвертинними амонійними сполуками та наночастинками срібла, а також запропоновано комплексний препарат «Асепт» для аерозольного застосування в присутності тварин.

References

- Boiko, O.P., Sen, O.M., Boiko, P.K., Kurtiak, B.M., Pundiak, T.O., & Sobko, G.V. (2017). Characteristics of morphological signs and physiological properties of salmonel stems, isolated from birth and television. *Scientific Messenger LNUVMB*, 19(78), 129–135. doi:10.15421/nvlvet7826.
- Gutyj, B., Grymak, Y., Hunchak, V., Mysak, A., Nazaruk, N., Brezvyin, O., Hariv, I., Shcherbaty, A., Semeniv, B., Bushueva, I., Parchenko, V., & Kaplaushenko, A. (2018). Preclinical searches of the preparation Threomagnile. *Ukrainian Journal of Ecology*. 8(1), 688–695. doi: 10.15421/2018_267.
- Hanaki, H., & Hiramatsu, K. (2001). Detection methods of glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus*. *Susceptibility testing. Methods in Molecular Medicine*. 48, 85–91 doi: 10.1385/1-59259-077-2:85.
- Homzykov, O.M. (2006). Profilaktyka ta likuvannia hostrykh respiratornykh zakhvoriuvan teliat aerozoliamy aktyvnykh biolohichnykh preparativ. Epizootolohiia i profilaktyka infektsiinykh khvorob velykoi rohatoi khudoby: Mizhnarodna nauk.-prakt. konf.: Tezy dopovidei. K.: NAU, 25 (in Ukrainian).
- Kovalenko, V.L., & Nedosiekov, V.V. (2011). Kontsepsiia rozrobky ta vykorystannia kompleksnykh dezinfektantiv dlia veterynarnoi medytsyny: Monohrafiia (in Ukrainian).
- Kurtyak, B.M., Romanovych, M.S., Pundiak, T.O., Romanovych, M.M., Romanovych, L.V., & Sobko, G.V. (2017). Ecological features of episodic processes. *Scientific Messenger LNUVMB*, 19(78), 108–111. doi:10.15421/nvlvet7822.
- Kysera, Ya.V., Storzhak, Yu.G., & Gutyj, B.V. (2018). Experimental study of immunoprophylactic anti-pneumococcal medicine and its immunogenic properties. *Ukrainian Journal of Ecology*. 8(1), 307–316. doi: 10.15421/2018_216.
- Levkivska, N., Gutyj, B., & Levkivskiy, D. (2016). Comparative effectiveness therapeutic and prophylactic preparations when applying 3% of ethanol–water emulsion of propolis and antibiotics for catarrhal pneumonia in calves. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*. 18, 2(66), 116–121. doi:10.15421/nvlvet66024.
- Lorian, V. (1996). *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Vasilyeva, T.B. (2016). The monitoring of epizootic situation of colibacteriosis in Ukraine during 2004 – 2015. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 2(66), 30–34 doi:10.15421/nvlvet6607.
- Weidemann, B. (1998). Evaluation of data from susceptibility testing. *International journal of antimicrobial agents*. 10, 218–219.