

## УДК 636.9:614.3.7:636.4

**КОВАЛЕНКО В.Л.**, д-р. вет. наук, ст. наук. сп.,  
e-mail: kovalenkodoktor@gmail.com

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

**ГАРКАВЕНКО В. М.**, e-mail: gvm77@i.ua

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ.*

**КОВАЛЕНКО П.Л.**, PhD., e-mail: kov.pav@gmail.com

*Toxikon Corporation, Bedford, MA USA*

**ПОНОМАРЬОВА С.А.**, стар. наук. сп., e-mail: vitlan18@gmail.com

*Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів*

## ВИВЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЕФІРНИХ ОЛІЙ ТА ЇХ КОМПОЗИЦІЙ НА МІКРООРГАНІЗМАХ

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 на мікроорганізмах. В дослідях з тест-мікроорганізмами *S. aureus*, *St. thermophiles*, *P. multocida* підтверджена бактерицидна дія ефірних олій чебрецю, пихти і евкаліпту та підтверджено можливість їх підсилення додаванням четвертинних амонійних сполук та наночастинками срібла. Дослідженнями доведено доцільність використання рослинних ефірних олій для конструювання високоефективних препаратів та запропоновано комплексний препарат «Барез» 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 їх основі лежать інфекційні захворювання переважно бактерійного походження. В той же час 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.

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 по утриманню та годівлі тварин [1, 2, 3, 4].

**Мета роботи:** Підбір та вивчення ефективності субстанцій, компонентів, необхідних для розробки комплексних бактерицидних засобів та вивчення їх 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 [2, 6].

**Матеріали та методи досліджень.** В роботі використовували як різні бактерицидні субстанції бензалконія хлорид, наночастинки срібла, так і перспективні в цьому напрямку ефірні олії рослин: чебрецю, пихти, евкаліпту.

Застосовували поживні середовища: МПАХ, МПА, МПБХ, МПБ, середовище Сабуро, тіогліколеве середовище. Всі середовища готували згідно настанов 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 їх ліпофільними компонентами, і можливими зменшеннями зон затримки росту на агарі в порівнянні 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 наступним культивуванням в умовах, оптимальних для мікроорганізмів; методу дифузії в агар з 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 враховуванням 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, *B. subtilis* ATCC6633, *B. cereus* ATCC 10702, *S. aureus* 209-P, *St. thermophilus*, *Klebsiella* spp, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Pasterella 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 (10×10 см) інфікували суспензією одностовової агарової культури *E. coli* (шт. 1257) і *S. aureus* (шт. 209-P) з розрахунку 2 млрд. мікробних клітин в 1 см<sup>3</sup> суспензії культур, приготовлених відповідно до оптичного стандарту МакФарланда на 100 см<sup>2</sup> поверхні.

В контрольних дослідах 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 загальноприйнятою методикою (відмивання центрифугуванням, висівом центрифугату на 50%-ний сахарозний МПБ з пересівом через 24 години, інкубування в термостаті при температурі 37 °С, для виділення *E. coli* використовували середовище Ендо, та 8,5 %-ний сольовий МПА для індикації *S. aureus*).

Ефективність знезаражування визначали по наявності або відсутності росту тест-культур на живильних середовищах при інкубації посівів у термостаті при 37 °С через 48 годин і 7 діб [1, 2, 3, 4, 5].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результати дослідів з визначення антимікробної активності ефірних олій рослин (чебрецю, пихтової та евкаліптової) та в

поєднанні них з підсилювачами антимікробної дії – четвертинними амонійними сполуками та наночастинками срібла до мікроорганізмів *S. aureus*, *St. thermophilus*, *P. multocida*. Результати досліджень викладені в таблиці 1.

Отримані дані свідчать про високу антимікробну активність ефірних олій чебрецю, евкаліпту 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 *St. thermophilus*, *S. aureus*, *P. multocida*, а при застосуванні тих же сумішей із додаванням бензалконія хлориду та наночастинок срібла – значно підсилювалась антимікробна дія.

Таблиця 1

**Результати вивчення антимікробної дії ефірних олій та композицій на тестові мікроорганізми *St. thermophilus*, *S. aureus*, *P. multocida***

Розчини (зависі) ефірних олій та їхні суміші в МПБ (0,05 мл на диск)	Діаметр зон затримки росту (мм)		
	<i>St. thermophilus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. multocida</i>
Бензалконіум хлорид (0,1%)	22±3	27±2	19±2
Піхтова ефірна олія	21±2	22±3	15±1
Евкалиптова ефірна олія	15±1	13±1	18±2
Ефірна олія чебрецю	18±2	25±3	19±1
Суміш ефірних олій з додаванням бензалконіуму хлориду (0,1%)	25±3	29±2	26±3
Суміш ефірних олій з додаванням бензалконіуму хлориду (0,1%) та наночастинок срібла	33±2	35±3	36±1
Контроль	Суцільний ріст	Суцільний ріст	Суцільний ріст

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 знаходились в межах 13 – 36 мм. По ефективності антибактеріальної дії ефірні олії визначились наступним порядком: чебрець, піхта, евкаліпт.

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

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>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>
Евкалипту	19	17	23	21	22
Піхти	20	19	25	19	23
Чебрець	21	22	27	22	25

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		Чебрець		Евкалипту	
	100	50	100	50	100	50
<i>E. coli</i>	32	10	33	17	31	12
<i>Salmonella typhimurium</i>	29	13	26	12	27	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	15	35	19	33	18
<i>St. thermophilus</i>	19	11	46	22	41	23
<i>Pasteurella multocida</i>	27	18	29	13	23	11
<i>Klebsiella spp</i>	24	11	25	12	21	10
<i>Clostridium perfringens</i>	27	19	33	15	26	13

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

Зони затримки росту мікроскопічних пліснявих грибів (при нанесенні на паперові диски 0,1 – 0,3 мл ефірних олій) знаходились в межах 20–39 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 та перспективи подальших досліджень.** В дослідах з тест-мікроорганізмами *S. aureus*, *St. thermophilus*, *P. multocida* підтверджена бактерицидна дія ефірних олій чебрецю, піхти і евкаліпту 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.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine/ 4th ed. –1996.- Baltimore:Williams and Wilkins.- 642P.
2. Weidemann B. Evaluation of data from susceptibility testing./ International journal of antimicrobial agents. – 1998.- №10. – P.218 –219
3. Гомзиков О.М. Профілактика та лікування гострих респіраторних захворювань телят аерозолями активних біологічних препаратів // Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби: Міжнародна наук.-практ. конф.: Тези доповідей. – К.: НАУ, 2006. – С. 25.
4. Коваленко В. Л. Визначення ефективності знезараження дезінфектантом діамант на тест-об'єктах. / В. Л. Коваленко, М. Ф. Яценко, А. І. Чехун // Міжвідомчий тематичний науковий збірник УААН. Харків: Ветеринарна медицина. – 2008. – Т. 91 – С. 220–222.
5. Hanaki H., Hiramatsu K. Detection methods of glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus*. Susceptibility testing / Methods in Molecular Medicine vol 48:Antibiotic resistance methods and protocols. – 2003. – Humana press.- P.85 – 91
6. Коваленко В.Л. Концепція розробки та використання комплексних дезінфектантів для ветеринарної медицини: Монографія / В.Л. Коваленко, В.В. Недосєков. – К., 2011. – 146 с.

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И ИХ КОМПОЗИЦИЙ НА МИКРООРГАНИЗМАХ** / Коваленко В.Л., Гаркавенко В. М., Коваленко П.Л., Пономарева С.А.

*В статье представлена информация по подбору и изучению эффективности субстанций, компонентов с эфирными маслами, необходимых для разработки комплексных бактерицидных средств и изучения их антимикробной активности на микроорганизмах. В опытах с тест-микроорганизмами *S. aureus*, *St. thermophiles*, *P. multocida* подтверждены бактерицидные действия эфирных масел эвкалипта и пихты и подтверждена возможность их усиления добавлением четвертичных аммонийных соединений и наночастиц серебра. Исследованиями доказано целесообразность использования растительных эфирных масел для конструирования высокоэффективных препаратов, а также предложен комплексный препарат «Барез» для аэрозольного применения в присутствии животных.*

**Ключевые слова:** Эфирные масла, микроорганизмы, бензалкония хлорид, наночастицы, бактерицидное средство.

**THE STUDY OF ESSENTIAL OIL ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND THEIR COMPOSITION ON MICROORGANISM** / Kovalenko V. L., Garkavenko V.M., Kovalenko P.L., Ponomarova S.A.

**Introduction.** Livestock farms suffer the greatest losses from diseases of the respiratory and gastrointestinal system. At the same time, there are many factors, both biotic and abiotic, which are the trigger and which significantly affect the further development of these diseases, efficiency of methods and means of their prevention and treatment.

Therefore, the problems of prevention and elimination of animals' bacterial diseases in industrial farms need to be solved in complex with the solution of other technological problems of the animal feeding and care.

**The goal of the work.** Selection and study of the efficiency of substances, components, necessary for the development of complex antibacterial agents. Study of their antimicrobial activity to microorganisms.

**Materials and methods.** Different antibiotic substances of benzalkonium chloride, silver nanoparticles and promising in this direction essential oils of plants: thyme, fir, eucalyptus were used for the work.

Nutrient medias were used: NA, NB, Saburo medium, thioglycolic medium.

For the determination of the antimicrobial activity of essential oils, the following test cultures were used: *Micrococcus luteus* ATCC9341, *B. subtilis* ATCC6633, *B. cereus* ATCC 10702, *S. aureus* 209-P,

*St. thermophiles, Clostridium perfringens, Klebsiella spp, Salmonella typhimurium, Pasterella multocida, Penicillium citrin, Penicillium urticae, Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus.*

*In control tests the similarly infected test objects were sprayed with a physiological solution. In each experiment at least three test objects were used. Essential oils were applied to test objects at concentrations of 1:4000 - 1:8000.*

*The efficiency of disinfection was determined by the presence or absence of test cultures, growth on nutrient medias during the incubation of crops in a thermostat at 37°C in 48 hours and 7 days.*

**Results of the research and discussion.** *The obtained data show high antimicrobial activity of essential oils of thyme, eucalyptus and fir, especially of their mixtures with benzalkonium chloride. The addition of silver nanoparticles significantly increases the antibiotic action of essential oil solutions. Using pure essential oils and mixtures of essential oils we observed the growth inhibition of S. aureus, St. thermophilus, P. multocida test microorganisms. Using the same mixtures with the addition of benzalkonium chloride and silver nanoparticles we observed the antimicrobial activity.*

*We studied the minimum effective quantities and concentrations of essential oils to test microorganisms and some pathogenic isolates. Method of diffusion in agar was used. We applied 0.1 - 0.3 ml of essential oil to paper disks and measured the zones of growth inhibition of the studied cultures that were located within 13 - 36 mm. By the effectiveness of antibacterial action essential oils were determined in the following order: thyme, fir, eucalyptus.*

*When we applied essential oils into nutrient media in the ratios of 1:10 - 1:200, a different degree of antibacterial activity was observed for the bacterial cultures. By the efficiency of fungicidal action the essential oils were determined in the following order: thyme, fir, eucalyptus.*

**Conclusions and prospects for further research.** *In experiments with S. aureus, St. thermophilus, P. multocida test-microorganisms the antibiotic action of essential oils of thyme, fir and eucalyptus was confirmed and the possibility of its enhancement by the addition of quaternary ammonium compounds was confirmed.*

**Keywords:** *Essential oils, microorganisms, benzalkonium chloride, nanoparticles, germicide.*

## REFERENCES

1. Lorian, V. (1996). *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins [in English].
2. Weidemann, B. (1998). Evaluation of data from susceptibility testing. *International journal of antimicrobial agents*, 10, 218 – 219 [in English].
3. Homzykov, O.M. (2006). Profilaktyka ta likuvannia hostrykh respiratornykh zakhvoriuvan teliat aeroliamy aktyvnykh biolohichnykh preparativ [Prevention and treatment of acute respiratory diseases of calves with aerosols of active biological preparations]. *Epizootology and prophylaxis of infectious diseases of cattle '06: Mizhnarodna nauk.-prakt. konf.: Tezy dopovidei – International scientific and practical conference: Abstracts of reports*. (p. 25). Kyiv: NAU [in Ukraine].
4. Kovalenko, V.L., Yashchenko, M.F., & Chekhun, A.I. (2008). Vyznachennia efektyvnosti znezarazhennia dezinfektantom diamant na test-obiektakh [Determination of the effectiveness of decontamination of disinfectant diamond on test objects]. *Mizhvidomchyi tematychnyi naukovyi zbirnyk UAAN. Kharkiv: Veterynarna medytsyna – Interagency thematic scientific collection UAAS. Kharkiv: Veterinary Medicine*, 91, 220-222 [in Ukraine].
5. Hanaki, H., & Hiramatsu, K. (2003). *Detection methods of glycopeptide-resistant Staphylococcus aureus. Susceptibility testing. Methods in Molecular Medicine vol 48: Antibiotic resistance methods and protocols. Humana press.*, 85 – 91 [in English].
6. Kovalenko, V.L., & Nedosiakov, V.V. (2011). Kontseptsiiia rozrobky ta vykorystannia kompleksnykh dezinfektantiv dlia veterynarnoi medytsyny: Monohrafiia [Concept of development and use of complex disinfectants for veterinary medicine: Monograph]. Kyiv [in Ukraine].