

UNIwersytet WarMińsko-Mazurski
W OLSZTYNIE
WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Joanna Paulina Żebrowska

OPRACOWANIE I OCENA SKUTECZNOŚCI
PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ MIESZANINY
NATURALNYCH OLEJKÓW ETERYCZNYCH
DO PROFILAKTYCZNEGO ZAMGŁAWIANIA
WYCHOWALNI INDYKÓW

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Higieny Zwierząt i Środowiska
PROMOTOR: dr hab. Dorota Witkowska, prof. UWM

Olsztyn, 2021

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Joanna Paulina Żebrowska

OPRACOWANIE I OCENA SKUTECZNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ MIESZANINY NATURALNYCH OLEJKÓW ETERYCZNYCH DO PROFILAKTYCZNEGO ZAMGLAWIANIA WYCHOWALNI INDYKÓW

Intensywny system utrzymania drobiu oraz specyficzny mikroklimat kształtujący się w budynkach fermowych przyczynia się do kumulacji w środowisku bytowania ptaków bioaerozolu, którego głównym składnikiem są bakterie i grzyby, w tym patogenne lub oportunistyczne, jak i również ich metabolity. Sprzężone oddziaływanie czynników biologicznych jak i innych zanieczyszczeń powietrza uważa się za jeden z ważniejszych czynników stresogennych w odchowcie ptaków. Środowiskowe czynniki szkodliwe wpływają negatywnie na strukturę i funkcje obronne błon śluzowych, zwłaszcza układu oddechowego oraz spojówek, powodując reakcje alergiczne, stany zapalne i zwiększając zapadalność ptaków na choroby zakaźne. W stadach indyków rzeźnych często obserwowane są przypadki chorobowe o złożonej etiologii bakteryjnej wymagające leczenia, między innymi antybiotykami. Z kolei szerokie zastosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych w leczeniu infekcji bakteryjnych na fermach drobiu prowadzi do narastającej antybiotykooporności szczepów bakterii. Dlatego też, w poszukiwaniu skutecznych metod redukcji poziomów zanieczyszczeń w produkcji drobiarskiej, coraz większym zainteresowaniem cieszą się naturalne metody. Ze względu na bogaty skład chemiczny i szeroki zakres ich biologicznej aktywności dużym potencjałem w tym zakresie cechują się olejki eteryczne. Wszystkie dostępne publikacje naukowe z zakresu skuteczności przeciwdrobnoustrojowej olejków eterycznych przedstawiają wyniki badań *in vitro*, głównie na komercyjnych szczepach wzorcowych, a ich zastosowanie w produkcji drobiarskiej ogranicza się głównie do ich zastosowania w żywieniu. Wstępne badania prowadzone przez zespół badawczy Witkowska i in. (2013, 2016, 2019) wykazały, że zastosowanie wodnych roztworów pojedynczych olejków eterycznych w formie aerozolu ogranicza zanieczyszczenie mikrobiologiczne w środowisku kurcząt brojlerów. Jednak, jak podkreślają wyżej wspomniani autorzy należy pamiętać, iż nie wszystkie olejki wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe, a te które je posiadają mogą być nieskuteczne w niskich stężeniach. Niektóre dostępne na rynku olejki eteryczne, mimo wielu korzystnych cech mogą być toksyczne dla organizmów zwierzęcych, dlatego potrzebne

są dalsze badania nad ich właściwym doбором i sposobem zastosowania. Wychodząc naprzeciw powyższym kwestiom, w niniejszej pracy wykonano badania wrażliwości na wcześniej wyizolowanych drobnoustrojach pochodzących z ferm indyków.

Stąd też celem niniejszej pracy było określenie najczęściej występujących drobnoustrojów i lekooporności patogenów na fermach indyków rzeźnych. Następnie opracowanie naturalnego preparatu na bazie wybranych olejków eterycznych do profilaktycznego zamgławiania budynków fermowych przeznaczonych do wychowu indyków oraz zbadanie skuteczności przeciwdrobnoustrojowej naturalnego wieloskładnikowego preparatu na bazie olejków eterycznych po aplikacji w formie zamgławiania w środowisku bytowym indyków fermowych.

Badania przeprowadzono w trzech etapach. Materiał do I etapu badań stanowiły wyniki analiz bakteriologicznych narządów wewnętrznych indyków utrzymywanych na fermach zlokalizowanych w północno-wschodniej Polsce, zgromadzone w archiwum Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Olsztynie. II etap badań w skali laboratoryjnej zrealizowano w celu przygotowania naturalnego preparatu olejkowego o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych do profilaktycznego zamgławiania powietrza budynków dla indyków rzeźnych. W I etapie badań wykazano najczęstsze występowanie w stadach indyków rzeźnych szczepów bakterii, takich jak: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* oraz *Ornithobacterium rhinotracheale*, w związku z czym w II etapie wykorzystano terenowe izolaty tych bakterii oraz dwanaście 100% naturalnych olejków eterycznych. Metodami: dyfuzyjno-krażkową, studzienkową i mikrorozcieńczeń określono najbardziej skuteczne olejki eteryczne i ich minimalne stężenia hamujące (MIC) oraz przygotowano mieszaninę wybranych na podstawie powyższych badań olejków eterycznych z odpowiednim emulgatorem i wodą destylowaną, a także oceniono jej skuteczność metodą *in vitro*. W III etapie badań oceniono skuteczność przeciwdrobnoustrojową naturalnego preparatu olejkowego o szerokim spektrum działania w środowisku bytowania indyków. Badania przeprowadzono na fermie indyków rzeźnych zlokalizowanej w regionie północno-wschodniej Polski. Na etapie badań terenowych analiza mikrobiologiczna obejmowała identyfikację ilościową i jakościową mikroflory środowiskowej. Pobrano próby powietrza i ściółki oraz wymazy ze ścian, poideł, karmideł.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można sformułować następujące uogólnienia i wnioski:

1. Nie stwierdza się sezonowości w występowaniu bakterii *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* na fermach indyków rzeźnych.
2. W narządach wewnętrznych indyków rzeźnych najczęściej identyfikuje się bakterie *Enterococcus faecalis* (w tym szczepy MDR) i *E. coli*, a rzadziej bakterie *Ornithobacterium rhinotracheale*.
3. Zmienność aktywności przeciwbakteryjnej poszczególnych olejków eterycznych jest determinowana przez rodzaj badanego szczepu bakterii, stężenie olejku oraz zastosowaną metodę badawczą.
4. Najwyższą aktywnością przeciwbakteryjną zarówno drobnoustrojów G⁺ i G⁻ charakteryzuje się olejek cynamonowy. Olejek cytrynowy wykazuje znikome działanie przeciw bakteriom *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* pochodzącym od indyków rzeźnych.
5. Aplikacja preparatu na bazie olejków eterycznych w formie zamgławiania ogranicza występowanie mikroorganizmów w środowisku bytowania indyków rzeźnych.
6. Zastosowanie wieloskładnikowego komponentu wybranych olejków eterycznych poszerza spektrum działania i zwiększy aktywność przeciwdrobnoustrojową mieszaniny.
7. Zamgławianie powietrza wieloskładnikowym preparatem na bazie olejków eterycznych wykazuje wysoki potencjał zastosowanej mieszaniny w utrzymaniu standardów higienicznych na fermach indyków i może okazać się skuteczne w profilaktyce wobec patogennych (w tym wieloopornych) izolatów bakterii pochodzących z ferm indyczych.
8. Wskazane są dalsze badania nad doskonaleniem składu naturalnego preparatu na bazie olejków eterycznych i jego oddziaływaniem na organizm i fizjologię ptaków.

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY
IN OLSZTYN
FACULTY OF ANIMAL BIOENGINEERING



PHD THESIS

mgr inż. Joanna Paulina Żebrowska

DEVELOPMENT AND EVALUATION
OF ANTIMICROBIAL EFFICACY OF A MIXTURE
OF NATURAL ESSENTIAL OILS FOR PROPHYLACTIC
FOGGING OF TURKEY HOUSES

PhD thesis performed in the
Department of Animal and Environmental Hygiene
PROMOTER: dr hab. Dorota Witkowska, prof. UWM

Olsztyn, 2021

DOCTORAL DISSERTATION SUMMARY

mgr inż. Joanna Paulina Żebrowska

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL EFFICACY OF A MIXTURE OF NATURAL ESSENTIAL OILS FOR PROPHYLACTIC FOGGING OF TURKEY HOUSES

The intensive poultry housing system and the specific microclimate formed in farm buildings contribute to the accumulation of bioaerosol in the birds' living environment. Its main components are bacteria and fungi, including pathogenic or opportunistic ones, as well as their metabolites. The combined effect of biological agents and other air pollutants is considered one of the most important stress factors in bird rearing. Harmful environmental factors negatively affect the structure and defence functions of mucous membranes, especially of the respiratory system and conjunctiva, causing allergic reactions, inflammation and increased incidence of infectious diseases in birds. In flocks of slaughter turkeys, diseases of complex bacterial aetiology that require treatment, including antibiotics, are frequently observed. In turn, the widespread use of antimicrobials in the treatment of bacterial infections on poultry farms leads to increasing antibiotic resistance of bacterial strains. Therefore, in the search for effective methods to reduce contamination levels in poultry production, natural methods are gaining interest. Due to their rich chemical composition and wide range of biological activity, essential oils have great potential in this respect. All available scientific publications in the field of antimicrobial efficacy of essential oils present results of *in vitro* tests, mainly on commercial standard strains, and their application in poultry production is limited to their use in nutrition. Preliminary studies conducted by the research team of Witkowska et al. (2013, 2016, 2019) showed that the use of aqueous solutions of single essential oils in aerosol form reduces microbial contamination in the environment of broiler chickens. However, as highlighted by the aforementioned authors, it is important to remember that not all oils exhibit antimicrobial properties and those that do may not be effective at low concentrations. Some essential oils available on the market, despite many beneficial properties, may be toxic to animal organisms, therefore, further research is necessary for their proper selection and application. To address these issues, in this study, sensitivity tests were performed on previously isolated microorganisms from turkey farms.

Therefore, the aim of this work was to determine the most frequently occurring microorganisms and drug resistance of pathogens on turkey fattening farms, then to develop a natural preparation based on selected essential oils for prophylactic fogging of farm buildings intended for raising turkeys and to test the antimicrobial efficacy of a natural multicomponent preparation based on essential oils after application in the form of fogging in the living environment of farm turkeys.

The study was conducted in three stages. The material for the first stage of the study comprised the results of bacteriological analyses of internal organs of turkeys kept on farms located in north-eastern Poland, stored in the archives of the Department of Veterinary Hygiene in Olsztyn. This stage of research showed the most frequent occurrence in flocks of slaughter turkeys of bacterial strains such as: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Ornithobacterium rhinotracheale*. The second stage of the study was carried out in the laboratory and comprised the development of a natural oil preparation with antimicrobial properties for prophylactic fogging of air in buildings for slaughter turkeys. Field isolates of bacteria and twelve 100% natural essential oils were used for this purpose. The most effective essential oils and their minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined using the disk-diffusion, well and microdilution methods. Based on the results, individual essential oils were selected and mixed with appropriate emulsifiers and distilled water. The obtained preparation was tested for its effectiveness using the in vitro method. In the third stage of the study, carried out on a turkey fattening farm located in the north-east of Poland, the antimicrobial efficacy of the natural broad-spectrum essential oil preparation was evaluated in the turkey rearing environment. For this purpose, air and litter samples as well as swabs from walls, drinkers and feeders were taken. At this stage of field and laboratory studies, the microbiological analysis included quantitative and qualitative identification of environmental microflora.

Based on the results of the study, the following generalisations and conclusions can be made:

1. No seasonality is found in the occurrence of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* bacteria on slaughter turkey farms.
2. In the internal organs of turkeys for fattening, *Enterococcus faecalis* bacteria (including MDR strains) and *E.coli* are identified most frequently, and *Ornithobacterium rhinotracheale* bacteria are identified least frequently.

3. The variability of the antibacterial activity of individual essential oils is determined by the type of bacterial strain tested, the concentration of the oil and the test method used.
4. Cinnamon oil shows the highest antibacterial activity against both G+ and G- microorganisms. Lemon oil shows very weak activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* from slaughter turkeys.
5. The application of the essential oil-based preparation by fogging reduces the occurrence of microorganisms in the rearing environment of turkeys for fattening.
6. The use of a number of selected essential oils within one preparation enhances the effects and increases the antimicrobial activity of the mixture.
7. Air fogging with multicomponent preparation based on essential oils shows high potential of the applied mixture in maintaining hygienic standards on turkey farms and may prove effective in preventing pathogenic (including multiresistant) bacterial isolates originating from turkey farms.
8. Further studies aimed at improving the composition of the natural preparation based on essential oils and its effects on the organisms and physiology of birds are recommended.