

**ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET  
TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE  
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT**

---

**dr inż. Michalina Adaszyńska-Skwirzyńska**

**Rozprawa doktorska**

**WŁAŚCIWOŚCI ORAZ ZASTOSOWANIE OLEJKU  
ETERYCZNEGO Z LAWENDY LEKARSKIEJ  
W PRODUKCJI DROBIARSKIEJ**

*Rozprawa doktorska wykonana  
w Katedrze Nauk o Zwierzętach  
Monogastrycznych, Pracowni  
Drobiarstwa  
pod kierunkiem prof. dr hab. inż.  
Danuty Szczerbińskiej*

---

Szczecin 2021

*Składam serdeczne podziękowania:  
mojej **Rodzinie** – za nieustające wsparcie,  
oraz **Pani Prof. Danucie Szcherbińskiej** – za  
opiekę naukową, nieskończoną cierpliwość,  
życzliwość oraz wspaniałą atmosferę pracy*

**Publikacje naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską:**

[D-1] Adaszyńska-Skwirzyńska M., Szczerbińska D. Use of essential oils in broiler chicken production – a review. *Annals of Animal Sciences* **2017**, 2, 317–335.

**IF<sub>2017</sub> – 0,731; 20 pkt. MNiSW<sub>2017</sub>**  
**(100 pkt. MNiSW<sub>2019</sub>)**

[D-2] Adaszyńska-Skwirzyńska M., Szczerbińska D. The antimicrobial activity of lavender essential oil (*Lavandula angustifolia*) and its influence on the production performance of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **2018**, 102, 1020–1025.

**IF<sub>2018</sub> – 1,607; 30 pkt. MNiSW<sub>2017</sub>**  
**(100 pkt. MNiSW<sub>2019</sub>)**

[D-3] Adaszyńska-Skwirzyńska M., Szczerbińska D. The effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil as a drinking water supplement on the production performance, blood biochemical parameters, and ileal microflora in broiler chickens. *Poultry Science* **2019**, 98, 358–365.

**IF<sub>2019</sub> – 2,659; 140 pkt. MNiSW<sub>2019</sub>**

[D-4] Adaszyńska-Skwirzyńska M., Szczerbińska D., Zych S. Antibacterial activity of lavender essential oil and linalool combined with gentamicin on selected bacterial strains. *Medycyna Weterynaryjna* **2020**, 76, 2, 115–118.

**IF<sub>2020</sub> – 0,280; 20 pkt. MNiSW<sub>2019</sub>**

[D-5] Adaszyńska-Skwirzyńska M., Szczerbińska D., Zych S. The use of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil as an additive to drinking water for broiler chickens and its *in vitro* reaction with enrofloxacin. *Animals* **2021**, 11, 6, 1535.

**IF<sub>2020</sub> – 2,323; 100 pkt. MNiSW<sub>2019</sub>**

---

**Sumaryczny IF czasopism w roku opublikowania = 7,60**

**Suma punktów w roku opublikowania = 310**

**Suma punktów według obecnie obowiązującego wykazu czasopism MNiSW<sub>2019</sub> = 460**

## SPIS TREŚCI

1. Wykaz stosowanych symboli, oznaczeń i skrótów .....	2
2. Streszczenie .....	3
3. Abstract .....	5
4. Wprowadzenie, hipoteza badawcza i cel badań .....	7
4.1. Wprowadzenie .....	7
4.2. Hipoteza badawcza .....	9
4.3. Cel badań .....	9
5. Materiał i metody badań .....	10
5.1. Olejek eteryczny .....	10
5.1.1. Oznaczenie składu chemicznego metodą chromatografii gazowej z detektorem mas (GC/MS) .....	10
5.1.2. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej ( <i>in vitro</i> ).....	11
5.1.3. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz szacowanie oddziaływania z antybiotykami ( <i>in vitro</i> ) .....	12
5.2. Badania aplikacyjne na zwierzętach .....	17
5.2.1. Doświadczenia na zwierzętach .....	17
5.2.2. Wskaźniki produkcyjne .....	19
5.2.3. Wskaźniki surowicy krwi .....	19
5.2.4. Analiza wybranych grup bakterii w treści jelita biodrowego .....	19
5.3. Statystyczna ocena wyników.....	20
6. Wyniki badań .....	21
7. Dyskusja wyników.....	25
8. Wnioski.....	32
9. Literatura.....	33
10. Załączniki .....	40
10.1. Kopie artykułów stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej	
10.2. Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej	
10.3. Oświadczenia Współautorów artykułów naukowych	
10.4. Wykaz publikacji, doniesień oraz osiągnięć naukowych Autora (niestanowiących rozprawy doktorskiej)	

## 1. Wykaz stosowanych symboli, oznaczeń i skrótów

<i>Oznaczenie</i>	<i>Pełna nazwa</i>
<b>ALP</b>	fosfataza zasadowa
<b>ALT</b>	aminotransferaza alaninowa
<b>AST</b>	aminotransferaza asparaginianowa
<b>ATCC</b>	A amerykańska kolekcja szczepów wzorcowych
<b>BHA</b>	butylohydroksyanizol
<b>BW</b>	masa ciała
<b>BWG</b>	przyrost masy ciała
<b>CFU/JTK</b>	jednostki tworzące kolonie
<b>d</b>	dzień
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek
<b>DPPH</b>	2'2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
<b>FCR</b>	konwersja paszy
<b>FI</b>	spożycie paszy
<b>FIC</b>	frakcyjne stężenie hamujące
<b>FICI</b>	indeks frakcyjnego stężenia hamującego
<b>GC/MS</b>	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
<b>HDL</b>	lipoproteina o dużej gęstości
<b>JTK</b>	jednostki tworzące kolonie
<b>LEO</b>	olejek eteryczny z lawendy
<b>LDL</b>	lipoproteina o niskiej gęstości
<b>m/z</b>	stosunek masy jonu do jego ładunku
<b>MIC</b>	minimalne stężenie hamujące
<b>MRSA</b>	gronkowiec złocisty ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) oporny na metycylinę
<b>RI</b>	indeks retencji
<b>SEM</b>	błąd standardowy średniej
<b>TAS</b>	całkowity status antyutleniający
<b>UV-VIS</b>	spektroskopia w nadfiolecie i obszarze widzialnym
<b>WCR</b>	konwersja wody
<b>WI</b>	spożycie wody

## 2. Streszczenie

Kurczęta brojlery obecnie wykorzystywane w produkcji drobiarskiej charakteryzują się bardzo szybkim tempem wzrostu, przy jednocześnie większej podatności na różnego rodzaju zaburzenia zdrowotne, co często prowadzi do chorób. W związku z tym, że współczesne metody chowu drobiu zmierzają do ograniczenia stosowania syntetycznych dodatków, coraz większą uwagę zwraca się na naturalne produkty roślinne, które mogą być stosowane jako dodatki fitobiotyczne. Substancje syntetyczne charakteryzują się wieloma działaniami niepożądanymi oraz coraz mniejszą skutecznością w terapii zakażeń bakteryjnych. Zmniejszona skuteczność związana jest z powstawaniem szczepów opornych na działanie antybiotyków, dlatego też celowe jest poszukiwanie naturalnych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Celem badań było określenie wpływu olejku eterycznego z lawendy lekarskiej – **LEO** (*Lavandula angustifolia*) na cechy produkcyjne, skład mikroflory jelita biodrowego oraz wybrane wskaźniki biochemiczne, immunologiczne i antyoksydacyjne krwi kurcząt brojlerów, a także ocena jego oddziaływania *in vitro* w połączeniu z gentamycyną i enrofloksacyną, wobec wybranych szczepów bakterii. Łącznie przeprowadzono trzy doświadczenia z zastosowaniem olejku lawendowego jako dodatku do wody pitnej dla kurcząt brojlerów. Doświadczenia każdorazowo przeprowadzono na 300 nieseksowanych kurczętach brojlerach Ross 308. Jednodniowe pisklęta przydzielano do trzech grup doświadczalnych, po 100 osobników każda. W grupie kontrolnej – kurczęta otrzymywały przez cały okres odchowu wodę pitną bez dodatku LEO. W grupach doświadczalnych dodawano do wody pitnej olejek lawendowy w różnych stężeniach i przy różnej długości stosowania.

W I doświadczeniu olejek lawendowy aplikowano w stężeniu 0,2 i 0,4 mL/L. W II i III doświadczeniu, stosowano stężenie 0,4 mL/L, w grupie LEO<sub>1-42</sub> od 1. do 42. doby życia, natomiast w grupie LEO<sub>22-42</sub> od 22. do 42. Podczas doświadczeń określano masę ciała (BW) kurcząt, spożycie paszy (FI), spożycie wody (WI) oraz rejestrowano upadki i brakowania zdrowotne. W 42. dniu życia od kurcząt pobierano próby krwi, które poddano oznaczeniom wybranych wskaźników biochemicznych (fosfatazy zasadowej – ALP, aminotransferazy alaninowej – ALT, aminotransferazy asparaginianowej –AST, cholesterolu, glukozy, triglicerydów, kwasu moczowego, białka całkowitego), immunologicznych (immunoglobuliny: IgA, IgG, IgM) i antyoksydacyjnych (całkowitego statusu

antyoksydacyjnego –TAS). Badanie oddziaływania połączenia olejku lawendowego z enrofloksacyną i gentamycyną przeprowadzono metodą szachownicy (*checkerboard*).

Wyniki badań dowiodły, że dodatek olejku lawendowego do wody pitnej dla kurcząt brojlerów miał pozytywny wpływ na końcową masę ciała kurcząt oraz FCR ( $p < 0,01$ ).

Nie odnotowano natomiast różnic między grupami w przypadku spożycia paszy i wody, przeżywalności oraz wskaźników biochemicznych i immunologicznych krwi ( $p > 0,05$ ). Wykazano, że olejek lawendowy podwyższył całkowity status antyoksydacyjny (TAS) surowicy krwi ( $p < 0,01$ ).

Analiza składu treści jelita biodrowego wykazała, że liczebność poszczególnych grup drobnoustrojów, z wyjątkiem *Escherichia coli*, coliform oraz bakterii probiotycznych u kurcząt otrzymujących olejek lawendowy była porównywalna z wartościami uzyskanymi w grupie kontrolnej. Wykazano, że olejek lawendowy charakteryzuje się właściwościami modyfikującymi mikroflorę przewodu pokarmowego względem *Escherichia coli* i coliform ( $p < 0,01$ ). W żadnej próbce nie wykryto obecności beztlenowych laseczek z grupy *Clostridium* sp.

Z kolei, badania oddziaływania olejku lawendowego w połączeniu z enrofloksacyną i gentamycyną wykazały dwa typy oddziaływań: synergistyczne lub addytywne. Oddziaływanie synergistyczne stwierdzono w połączeniu olejku lawendowego z enrofloksacyną wobec antybiotykoopornych szczepów *Escherichia coli* (wskaźnik FICI: 0,22 – 0,50) oraz gentamycyną wobec szczepów *Staphylococcus aureus* (wskaźnik FICI: 0,14 – 0,19).

### 3. Abstract

Broiler chickens currently used in poultry production are characterized by a very fast growth rate and, at the same time, higher susceptibility to various types of health disorders, which often leads to diseases. Increasing attention is paid to natural plant products that can be used as phytobiotic additives due to the fact that modern methods of poultry rearing are aimed at limiting the use of synthetic additives. Synthetic substances are characterized by many side effects and are less effective in the treatment of bacterial infections. The reduced effectiveness is related to the emergence of antibiotic-resistant strains, therefore it is advisable to search for natural substances with antimicrobial activity.

The aim of the study was to determine the effect of lavender essential oil – **LEO** (*Lavandula angustifolia*) on production characteristics, ileum microflora composition and selected blood biochemical, immunological and antioxidant indices of broiler chickens, as well as to evaluate its *in vitro* effect in combination with gentamicin and enrofloxacin on selected bacterial strains. A total of three experiments were conducted with the use of lavender oil as an additive to drinking water for broiler chickens. Each experiment was carried out using 300 unsexed Ross 308 broiler chickens. One-day-old chicks were assigned to three experimental groups of 100 animals each. Chickens in the control group received drinking water without the addition of lavender essential oil throughout the rearing period. In the experimental groups, lavender oil was added to drinking water at different concentrations and for different time periods.

In the first experiment, lavender oil was applied in a concentration of 0.2 and 0.4 mL/L. In experiments 2 and 3, a concentration of 0.4 mL/L was used, from day 1 to 42 in the LEO<sub>1-42</sub> group, and from day 22 to 42 in the LEO<sub>22-42</sub> group. During the experiments, chicken body weight, feed and water consumption were determined, and deaths and culls were recorded. On the 42nd day of life, blood samples were collected from the chickens, which were used to determine selected biochemical (alkaline phosphatase – ALP, alanine aminotransferase – ALT, aspartate aminotransferase – AST, cholesterol, glucose, total protein, triglyceride and uric acid), immunological (IgA, IgG and IgM isotypes) and antioxidant (total antioxidant status – TAS) indices. The effect of the combination of lavender oil with enrofloxacin and gentamicin was tested using the checkerboard method.

The results showed that the addition of lavender oil to drinking water for broiler chickens had a positive effect on final body weight of chickens and FCR ( $p < 0.01$ ).



However, there were no differences between the groups in terms of feed and water consumption, survival, and biochemical and immunological blood indices ( $p > 0.05$ ). Lavender oil was demonstrated to increase total antioxidant status of blood serum ( $p < 0.01$ ).

The analysis of iliac intestine content composition showed that the abundance of individual groups of microorganisms, except for *Escherichia coli*, coliforms and probiotic bacteria, in chickens receiving lavender oil was comparable to the values obtained in the control group. It was shown that lavender oil exhibited properties modifying the gastrointestinal tract microflora in relation to *Escherichia coli* and coliforms ( $p < 0.01$ ). The presence of anaerobic bacilli from the *Clostridium* sp. group was not detected in any sample.

In turn, the analysis of the effect of lavender oil in combination with enrofloxacin and gentamicin demonstrated two types of interactions: synergistic or additive. The synergistic effect was found in the combination of lavender oil with enrofloxacin against antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains (FICI index: 0.22 – 0.50) and gentamicin against *Staphylococcus aureus* strains (FICI index: 0.14 – 0.19).

## 4. Wprowadzenie, hipoteza badawcza oraz cel badań

### 4.1. Wprowadzenie

Od co najmniej dekady w produkcji drobiarskiej i przemyśle paszowym promuje się stosowanie preparatów zawierających składniki biologicznie czynne, o działaniu zbliżonym do antybiotykowych stymulatorów wzrostu, zakazanych przez Unię Europejską. W związku z tym od wielu lat odnotowuje się duże zainteresowanie możliwościami wykorzystania wtórnych metabolitów roślinnych, w tym także olejków eterycznych jako substancji, mających działanie przeciwbakteryjne i immunostymulujące (**publikacja D-1**). Dotychczas przeprowadzono wiele badań z tego zakresu, w których dowiedziono m.in., że aktywność biologiczna lotnych metabolitów roślinnych umożliwia ich wykorzystanie w żywieniu zwierząt, profilaktyce weterynaryjnej czy też w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Produkcja młodego drobiu rzeźnego skupia się na osiągnięciu maksymalnego wyniku, czyli szybkiego tempa wzrostu kurcząt przy niskim spożyciu paszy oraz optymalnej zdrowotności stada. Olejki eteryczne mogą stymulować wzrost oraz prawidłowe funkcjonowanie organizmu, co przekłada się na zdrowie a także wskaźniki produkcyjne drobiu. Te lotne metabolity roślinne są przedmiotem eksperymentów zarówno w warunkach *in vitro*, *in vivo* oraz na fermach drobiu. Wiele badań wskazuje na pozytywny wpływ olejków eterycznych na wskaźniki produkcyjne kurcząt brojlerów, m.in.: poprawę FCR, BWG, a także większą odporność i zdrowotność stad (**publikacja D-1**). Dlatego też produkuje się coraz więcej preparatów dla drobiu zawierających w składzie olejki eteryczne, o silnym działaniu bakteriostatycznym. Niewątpliwie ogromną zaletą jest to, iż dotychczas nie stwierdzono oporności patogenów na składniki olejkowe (Nazzaro i in., 2013; Nehme i in., 2021). Olejki stosuje się w dość szerokim zakresie dawkowania, a ich niekwestionowanym atrybutem, jest także możliwość podawania wraz ze szczepionkami. Substancje fitobiotyczne nie obciążają organizmu ptaków w przeciwieństwie do chemioterapeutyków. Nie wymagają także okresu karencji, co poprawia bezpieczeństwo produktów żywnościowych (**publikacja D-1**). Olejki eteryczne to lotne mieszaniny substancji organicznych, wydzielane z roślin lub ich części. Mają intensywny zapach i zróżnicowany skład, a ich najcenniejszymi składnikami są połączenia tlenowe: estry, alkohole alifatyczne lub terpenowe, aldehydy, ketony, tlenki (epoksydy) i laktony. Olejki zawierają nawet do kilkuset związków chemicznych, głównie z grupy terpenoidów, dzielących się na monoterpenoidy, seskwiterpenoidy, diterpenoidy, triterpenoidy, tetraterpenoidy oraz politerpenoidy (Nazzaro i in., 2013; Nehme i in., 2021). Determinuje to ich wielokierunkowe działanie biologiczne,

które w dość dużym stopniu warunkowane jest składnikiem dominującym. Olejki wykazują wiele cech wspólnych m.in. są lotne z parą wodną, mają charakter lipofilny, w temperaturze 18°C są cieczami oraz są optycznie czynne, dobrze rozpuszczają się w alkoholu etylowym, glikolu propylenowym czy lipidach (**publikacja D-1**).

Piśmiennictwo donosi o szerokich właściwościach: przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, przeciwutleniających, przeciwwirusowych, a także immunostymulujących olejków eterycznych (**publikacja D-1**; Ju i in., 2020; Nehme i in., 2021). Dzięki rozwojowi metod analitycznych możemy obecnie określić, które z lotnych metabolitów wtórnych roślin mogą być skutecznymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi, immunostymulującymi czy naturalnymi promotorami wzrostu, mającymi zastosowanie w produkcji drobiarskiej. Te lotne metabolity roślinne oraz ich składniki wykorzystywane są jako dodatki do paszy oraz wody, ale mają także zastosowanie w utrzymywaniu higieny obiektów, np. przez zamgławianie czy inhalacje. Obecnie, gdy oporność mikroorganizmów na antybiotyki syntetyczne jest poważnym problemem zarówno weterynaryjnym, jak i ekonomicznym, poszukuje się naturalnych alternatyw, mogących zastąpić lub wspomagać w działaniu środki syntetyczne (oddziaływanie synergistyczne). Należy podkreślić, iż lotne metabolity wtórne roślin charakteryzują się łagodniejszym, bardziej skutecznym i kompleksowym działaniem, w porównaniu do niektórych substancji syntetycznych (Brenes i Roura, 2010; Jafari i in., 2011; Mahboubi i in., 2013; Venkitanarayanan i in., 2013; Ju i in., 2020; Nehme i in., 2021).

Lawenda lekarska (*Lavandula angustifolia*) należy do najczęściej uprawianych roślin olejkowych używanych w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz chemiczno-kosmetycznym (Kara i Baydar, 2013; Prusinowska i in., 2016; Wells i in., 2018). Mimo popularności i długiej tradycji stosowania lawendy, badania nad poszczególnymi kierunkami jej aktywności biologicznej są nadal prowadzone. Oporność bakterii na antybiotyki syntetyczne stanowi złożony problem, zarówno medycyny weterynaryjnej jak i ludzkiej, dlatego stała się jednym z największych wyzwań zdrowotnych XXI wieku. Dostępne dane literaturowe sugerują, że lotne metabolity roślinne, w tym **olejek eteryczny z lawendy lekarskiej (LEO)** mogą stanowić alternatywę w zwalczaniu bakterii patogennych, które wykształciły oporność na wiele antybiotyków (Shafaghat i in., 2012; de Rapper i in., 2016). Udowodniono, że LEO wykazuje silne działanie bakteriobójcze wobec *Staphylococcus aureus* MRSA, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, a także bakterii z rodzaju *Enterococcus sp.* opornych na wankomycynę (Adaszyńska i in., 2013; de Rapper i in., 2013; de Rapper i in., 2016; Wells i in., 2018). Mimo, że w literaturze światowej pojawia się coraz więcej prac poświęconych

wykorzystaniu olejków eterycznych w produkcji drobiarskiej, to jednak niewiele z nich przedstawia badania nad zastosowaniem LEO. Była to jedna z głównych przesłanek podjęcia badań nad jego właściwościami i potencjalnym zastosowaniem w tuczu kurcząt brojlerów.

#### **4.2. Hipoteza badawcza**

Przyjęto, że dodatek LEO do diety kurcząt brojlerów może mieć wpływ na:

- przyrosty masy ciała,
- spożycie i wykorzystanie paszy,
- spożycie i wykorzystanie wody,
- przeżywalność,
- mikroflorę jelita biodrowego,
- wskaźniki surowicy krwi (wskaźniki biochemiczne, immunologiczne, całkowity status antyoksydacyjny).

Ponadto założono, że LEO może wykazywać działanie przeciwdrobnoustrojowe, synergistyczne z chemioterapeutykami stosowanymi w lecznictwie weterynaryjnym, podwyższając ich aktywność. Skojarzone działanie LEO i syntetycznych antybiotyków może mieć zastosowanie w zwalczaniu drobnoustrojów opornych na stosowane u drobiu chemioterapeutyki.

#### **4.4. Cel badań**

Głównym celem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej była ocena przydatności wykorzystania LEO w produkcji drobiarskiej jako substancji biologicznie aktywnej.

##### **Szczegółowe cele badań:**

- ✓ analiza właściwości LEO, obejmująca oznaczenie składu chemicznego, aktywności przeciwutleniającej i przeciwdrobnoustrojowej;
- ✓ ocena wpływu zastosowania LEO jako dodatku do wody pitnej dla kurcząt brojlerów na: wskaźniki produkcyjne (BW, BWG, FI, FCR, WI, przeżywalność); liczebność mikroorganizmów w treści jelita biodrowego; wskaźniki surowicy krwi (wybrane wskaźniki biochemiczne, całkowity status antyoksydacyjny, immunoglobuliny);
- ✓ ocena oddziaływania LEO z chemioterapeutykami wobec wybranych szczepów drobnoustrojów.

## 5. Materiał i metody badań

### 5.1. Olejek eteryczny

Materiał badawczy stanowił komercyjny olejek eteryczny z kwiatów lawendy lekarskiej – *Lavandula angustifolia* (Avicenna Oil, Wrocław, Polska). LEO zakupiony został u producenta, który podaje, że do jego izolacji zastosowano metodę destylacji z parą wodą. Zastosowany w badaniach olejek eteryczny spełniał wymogi normy PN-ISO 3515:2004.

#### 5.1.1. Oznaczenie składu chemicznego metodą chromatografii gazowej z detektorem mas (GC/MS)

Analizy chromatograficzne olejku eterycznego wykonano z zastosowaniem chromatografu gazowego firmy Agilent Technologies 6890N z detektorem mas 5973 Network, wyposażonego w automatyczny dozownik próbek 7683 Series Injector. Przygotowanie próbki do analizy polegało na rozpuszczeniu 0,2 mL badanego olejku eterycznego w 1,0 mL acetonu. Nastrzyk każdej próbki powtarzano trzykrotnie. Warunki analiz chromatograficznych zostały dobrane eksperymentalnie, w celu optymalnego rozdziału analitów. Użyto kolumny kapilarnej HP-5MSI o następujących parametrach: długość – 30 m, średnica – 0,25 mm. Grubość filmu fazy stacjonarnej wynosiła 0,25  $\mu\text{m}$ , a stosowanym gazem nośnym był hel o prędkości przepływu: 1,2  $\text{cm}^3/\text{min}$ . Temperatura dozownika wynosiła 250°C, temperatura źródła jonów 230°C, a temperatura kwadrupola 150°C. Dozowanie próbek o objętości 3  $\mu\text{L}$  odbywało się w trybie split (10:1). Analizy prowadzono w trybie scan w zakresie m/z od 40 do 500. Czas rozdziału analitów: 52 min. Zastosowano następujący program temperaturowy kolumny:

$$60^{\circ}\text{C} (3 \text{ min}) \xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}} 300^{\circ}\text{C} (1 \text{ min})$$

Do zbierania i obróbki danych wykorzystywano program ChemStation. Identyfikację związków obecnych w próbkach prowadzono na podstawie widm MS, porównując je z widmami wzorcowymi z biblioteki NIST 02 oraz za pomocą wyznaczonych indeksów retencji. Uwzględniano związki, których zgodność widm masowych z widmami wzorców z biblioteki widm wynosiła powyżej 95%. W celu potwierdzenia identyfikacji obliczono indeksy retencji badanych związków oraz porównano je z danymi literaturowymi (Babushok i in., 2011). Do wyznaczenia czasów retencji odpowiednich *n*-alkanów zanalizowano w tych samych warunkach chromatograficznych wzorzec *n*-alkanów C<sub>7</sub>–C<sub>30</sub> (Supelco, Bellefonte, USA). Następnie obliczono indeksy retencji, korzystając ze wzoru:

$$\text{LRI}_{\text{obl.}} = 100n + 100 \frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n}$$

gdzie:

$\text{LRI}_{\text{obl.}}$  – obliczony indeks retencji,

$t_x$  – czas retencji szukanego związku (min),

$t_n$  – czas retencji n - alkanu eluowanego bezpośrednio przed szukanym związkiem (min),

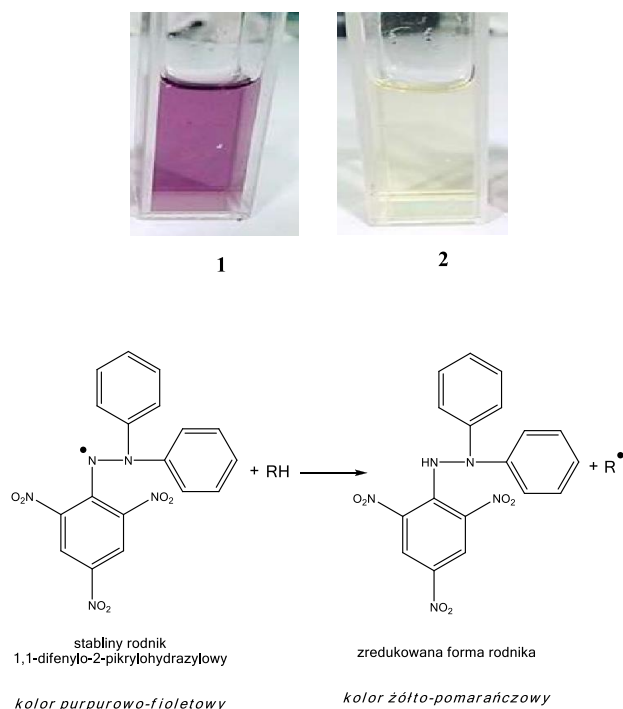
$t_{n+1}$  – czas retencji n - alkanu eluowanego bezpośrednio po szukanym związku (min).

Względną zawartość procentową analizowanych związków określano na podstawie udziału powierzchni ich pików w całkowitym prądzie jonowym wszystkich związków obecnych w badanej próbce (**publikacja D-2, publikacja D-3**).

#### 5.1.2. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej olejku eterycznego

Do oznaczenia aktywności przeciwutleniającej wykorzystano metodę polegającą na spektrofotometrycznym pomiarze spadku absorbancji barwnego rodnika azowego DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) (Alfa Aesar, Lancashire, UK) wywołanego działaniem przeciwutleniacza. Postęp reakcji redukcji rodnika po dodaniu przeciwutleniacza, LEO lub BHA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 517 \text{ nm}$  (Miguel, 2010).

Na rysunku 1 przedstawiono przykład zmiany barwy roztworu DPPH<sup>•</sup> po dodaniu substancji o działaniu przeciwutleniającym. Roztwór podstawowy LEO przygotowano z wykorzystaniem metanolu w stężeniu 1 mg/mL. Następnie przygotowano rozcieńczenia: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 i 7,81  $\mu\text{g/mL}$ . Rozcieńczone roztwory LEO (1 mL każdy) zmieszano z 1 mL metanolowego roztworu o stężeniu 1 mg/mL. Po 30 minutach inkubacji w ciemności w temperaturze pokojowej (22°C) rejestrowano absorbancję przy 517 nm przy użyciu spektrofotometru UV-VIS (GBC Scientific Equipment, model 916).



Rysunek 1. Redukcja rodnika DPPH po dodaniu przeciwutleniacza

Do analizy porównawczej wykonano identyczne rozcieńczenia roztworu BHA – syntetycznego przeciwutleniacza. Procent redukcji wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup> obliczano według wzoru:

$$\% \text{inhibicji} = 100 \frac{(A_0 - A_{\text{śr}})}{A_0}$$

gdzie:  $A_0$  – absorbancja rodnika;

$A_{\text{śr}}$  – średnia wartość absorbancji badanego roztworu zawierającego antyoksydant.

Na podstawie wykresu zależności redukcji wolnego rodnika DPPH<sup>•</sup> od stężenia przeciwutleniacza wyznaczono parametr IC<sub>50</sub>. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach (**publikacja D-5**).

### 5.1.3. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej i interakcji z antybiotykami

Całość badań mikrobiologicznych została wykonana w pracowni mikrobiologii Diagnostycznego Laboratorium Weterynaryjnego „Labo-Wet” S.J. (Szczecin, Polska), posiadającego certyfikat akredytacji nr AB 1516, które spełnia wymagania normy PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Ze względu na wrażliwość metody MIC na kontaminację, a także w celu

uzyskania jak najlepszej powtarzalności wyników, badania wykonywano z zachowaniem zasad spójności pomiarowej zgodnie z aktualnym dokumentem PCA DA-06:2015.

Do wstępnych testów aktywności przeciwdrobnoustrojowej LEO (**publikacja D-2**) wybrano siedem mikroorganizmów (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus*) pochodzących z uznanej kolekcji American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) oraz dwa antybiotykooporne izolaty (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) pochodzące z kolekcji szczepów laboratorium Labo-Wet (Szczecin, Polska). Właściwe oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej obejmowało ocenę wpływu LEO na komórki wzorcowych szczepów bakterii *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Ponadto, przeprowadzono ocenę aktywności LEO wobec klinicznych szczepów, *E. coli* oraz *S. aureus* (**publikacja D-4**, **publikacja D-5**). Charakterystykę mikroorganizmów użytych w badaniach przedstawia tabela 1.

Do analizy wrażliwości na enrofloksacynę i LEO (**publikacja D-5**) wybrano jeden szczep wzorcowy *E. coli* (KwikStik™, Microbiologics, St. Cloud, MS, USA) oraz pięć izolatów *E. coli* z przypadków zapalenia pępka i woreczka żółtkowego piskląt 1-dniowych, cechujących się w metodzie dyfuzyjno-krążkowej zmienną wrażliwością na standardowy krążek bibułowy enrofloksacyny 5 µg. Izolaty pochodziły z kolekcji szczepów Laboratorium Labo-Wet (Szczecin, Polska) wyizolowanych w latach 2014 – 2016 z piskląt pochodzących z kilku kolejnych wstawień (komercyjna ferma drobiu, Żabówko). Natomiast do analizy wrażliwości na gentamycynę i LEO (**publikacja D-4**) zastosowano dwa szczepy wzorcowe (*S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 9027) oraz jeden izolat z ropnych zmian skórnych konia, cechujący się w metodzie dyfuzyjno-krążkowej opornością na standardowy krążek gentamycyny 10 µg. Szczepy bankowano w systemach do archiwizacji szczepów ViaBank™ (BioMaxima, Gdańsk, Polska). Z 24 h hodowli szczepu roboczego bakterii (inkubacja w monitorowanej temperaturze  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) pobierano 2 ÷ 5 typowych kolonii i zawieszano w izotonicznym sterylnym 0,85% roztworze NaCl i mierzono gęstość optyczną na densytometrze (odchylenie pomiaru  $\pm 0,1$  w przedziale 0,00 ÷ 3,00 w skali McFarland'a) doprowadzając do zmętnienia równego 0,5 MF, co odpowiada przeciętnej ilości  $1,5 \times 10^8$  JTK/mL. Całość oznaczeń wykonano na indywidualnie pakowanych dzielonych sterylnych 96-studzienkowych polistyrenowych płytkach titracyjnych o płaskim dnie (**publikacja D-2**, **publikacja D-4**, **publikacja D-5**).



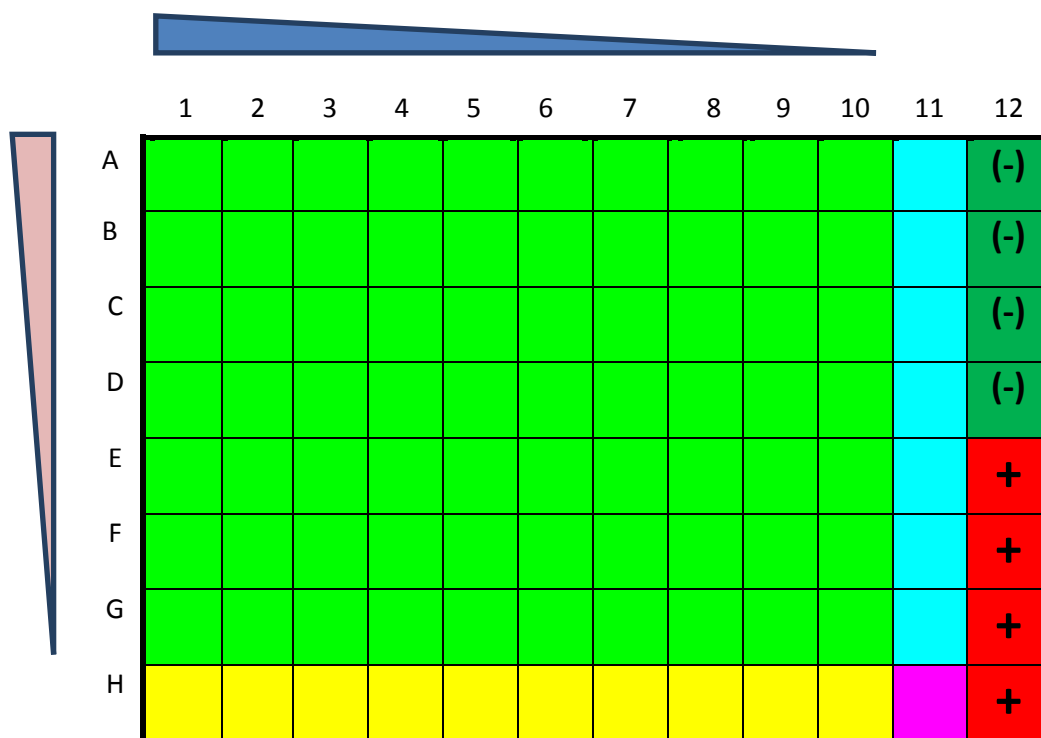
Tabela 1. Charakterystyka mikroorganizmów użytych w badaniach

Mikroorganizm	Rodzaj szczepu	Wrażliwość <sup>1</sup>	Strefa zahamowania wzrostu (mm)*
<i>Escherichia coli</i>	wzorcowy – ATCC 25922	S	35*
<i>Escherichia coli</i>	izolat	S	30*
<i>Escherichia coli</i>	izolat	I	21*
<i>Escherichia coli</i>	izolat	I	17*
<i>Escherichia coli</i>	izolat	R	12*
<i>Escherichia coli</i>	izolat	R	12*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	wzorcowy – ATCC 9027	S	21**
<i>Salmonella enteritidis</i>	wzorcowy – ATCC 13076	S	30*
<i>Salmonella pullorum</i>	wzorcowy – ATCC 13036	S	30*
<i>Salmonella typhimurium</i>	wzorcowy – ATCC 14028	S	28*
<i>Staphylococcus aureus</i>	wzorcowy – ATCC 25923	S	25**
<i>Staphylococcus aureus</i>	izolat	R	10**

<sup>1</sup> S (*susceptible*) – wrażliwy, I – (*intermediate*) średniowrażliwy, R (*resistant*) – oporny; \*krążek antybiotyczny enrofloksacyny (5µg); \*\*krążek antybiotyczny gentamycyny (10 µg)

W pierwszym etapie wyznaczono indywidualny MIC, czyli najmniejsze stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego całkowicie hamującego wzrost bakterii w studzienkach 96-dółkowej płytki mikrotitracyjnej (w układzie 12 x 8 [A ÷ H] – rysunek 2).

Dla każdego mikroorganizmu (0,5 MF zawiesiny bakteryjnej dodawanej w ilości 10 µL/studzienkę) wykonano wstępnie indywidualny MIC dla enrofloksacyny, gentamycyny i LEO przy użyciu metody mikrorozcieńczeń w pożywce płynnej (bulionie) wg Mueller-Hintona (pH 7,4 ± 0,2; Graso, Starogard Gdański, Polska).



Rysunek 2. Schemat rozmieszczenia próbek w kolumnach i rzędach układu szachownicy (checkerboard)

Dla enrofloksacyny (100 mg/mL, Bayer Animal Health, Leverkusen, Niemcy) wykonano serię rozcieńczeń dwukrotnych w zakresie od 0,001 ÷ 100 mg/mL, dla genatmicyny (256 mg/mL, Oxid Limited, Hampshire, Argentyna) 0,002 ÷ 256 µg/mL, a dla LEO (Avicenna, Wrocław, Polska) w zakresie 0,005 ÷ 50 % v/v. Na końcu każdej serii wykonano kontrolę negatywną (czysty bulion hodowlany wraz z wodą dejonizowaną lub DMSO) i pozytywną (bulion wraz z wodą dejonizowaną lub DMSO z dodatkiem zawiesiny bakteryjnej). Płytkę titracyjną nakrywano folią uszczelniającą z niewielkim dostępem tlenu i inkubowano w cieplarni w temperaturze + 37,0 ± 1°C przez 72 h. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach. Oznaczono w ten sposób MIC obserwowany oraz zakres stężeń dla enrofloksacyny, gentamicyny i LEO jako bazy dla MIC kombinowanego.

### *Kombinowany MIC*

Badanie oddziaływania LEO w połączeniu z antybiotykami (gentamycyną, enrofloksacyną) przeprowadzono metodą szachownicy (*ang. checkerboard*). Analogicznie jak w indywidualnym MIC, ponownie zastosowano seryjne mikrorozcieńczenia w bulionie Mueller-Hinton według schematu – rysunek 2 (**publikacja D-4, publikacja D-5**). Siedem gradientów stężeń LEO ułożonych było w rzędach A ÷ G, a dziesięć gradientów stężeń gentamycyny (**publikacja D-4**) lub enrofloksacyny (**publikacja D-5**) ułożonych było w kolumnach nr 1 ÷ 10 (Rys. 2.). Po wymieszaniu stanowiły one jedyny obszar bezpośredniej potencjalnej interakcji antybiotyk/LEO. Jako kontrolę pośrednią, w każdym doświadczeniu oznaczano aktywność zarówno samotnie działającej enrofloksacyny/gentamycyny (rzęd H, przy czym w tym rzędzie zamiast LEO zastosowano DMSO w identycznej objętości co nanoszony LEO) oraz LEO (kolumna nr 11; zamiast antybiotyku zastosowano wodę dejonizowaną w identycznej objętości). Kolumna nr 12 była kontrolą poprawnego przebiegu całego doświadczenia. Miarą sterylności użytych odczynników i zarazem obrazem ich klarowności były cztery kontrole negatywne. Miarą swobodnego wzrostu testowanego mikroorganizmu (pomimo obecności DMSO) były cztery kontrole pozytywne. Kompletną płytkę titracyjną nakrywano jednorazową folią ochronną z niewielkim dostępem tlenu, i inkubowano w cieplarni w temperaturze  $+ 37,0 \pm 1^\circ\text{C}$  przez 72 h. Każda szachownica wykonywana była trzykrotnie dla każdej bakterii. Płytkę odczytywano w czytniku mikroplatek BioTek Elx800 (zakres absorbancji  $0 \div 4,000$ ; Biokom, Biotek, Winooski, VT, USA). Wynikiem był odczyt i zapis absorbancji poszczególnych studzienek płytki przy zastosowanym filtrze o długości fali 650 nm.

W celu oceny charakteru oddziaływania kombinacji LEO/antybiotyk na badany szczep bakterii, dla każdej kombinacji wyliczono współczynnik FIC (*ang., Fractional Inhibitory Concentration*), a następnie ich sumę – FICI (Van Vuuren i Viljoen, 2011) zgodnie z poniższymi wzorami:

$$\text{FIC}_{\text{LEO}} = \text{MIC}_{\text{LEO w obecności antybiotyku}} / \text{MIC}_{\text{LEO}}$$

$$\text{FIC}_{\text{antybiotyku}} = \text{MIC}_{\text{antybiotyku w obecności LEO}} / \text{MIC}_{\text{antybiotyku}}$$

$$\text{FICI} = \text{FIC}_{\text{LEO}} + \text{FIC}_{\text{antybiotyku}}$$

Przyjęto następujące kryteria oceny wyników (Van Vuuren i Viljoen, 2011):

$FICI \leq 0,5$  oznacza wystąpienie silnego pozytywnego oddziaływania synergistycznego;

$0,5 < FICI \leq 1,0$  oznacza słabsze, ale również pozytywne oddziaływanie addytywne;

$1,0 < FICI < 2,0$  to brak oddziaływania (neutralne);

$FICI \geq 2,0$  to niekorzystne oddziaływanie antagonistyczne.

## 5.2. Badania na zwierzętach

### 5.2.1. Charakterystyka materiału zwierzęcego i schemat przeprowadzonych doświadczeń

W całym okresie badań przeprowadzono trzy doświadczenia na zwierzętach. Badania prowadzone były na fermie komercyjnej (Żabówko, Polska) na 300 (w każdym z doświadczeń) nieseksowanych kurczętach brojlerach Ross 308. Pisklęta zakupiono w komercyjnej wylęgarni (Park Drobiarski Sp. z o.o., Śmiłowo, Polska). Charakterystykę doświadczeń przedstawiono w tabeli 2. Jednodniowe pisklęta losowo przydzielono do trzech grup doświadczalnych, po 100 osobników każda. W grupie kontrolnej – kurczęta brojlery otrzymywały przez cały okres odchowu wodę pitną bez dodatku LEO (w każdym z doświadczeń). **W doświadczeniu I**, w grupach LEO<sub>0,2</sub> i LEO<sub>0,4</sub> codziennie, do 42. dnia tuczu, dodawano do wody pitnej LEO w stężeniu 0,2 i 0,4 ml/L (**publikacja D-2**). **W doświadczeniu II i III** w grupach LEO<sub>1-42</sub> i LEO<sub>22-42</sub> dodawano do wody pitnej LEO w stężeniu 0,4 ml/L, w grupie LEO<sub>1-42</sub> od 1. do 42. dnia życia, natomiast w grupie LEO<sub>22-42</sub> od 22. do 42 (**publikacja D-3, publikacja D-4**). Ptaki doświadczalne utrzymywano wraz ze stadem komercyjnym w tym samym pomieszczeniu przez okres 42 dni na ściółce ze słomy pszennej, przy obsadzie 14 osobników/m<sup>2</sup>. Wszystkie grupy miały ujednolicone, standardowe warunki środowiskowe, zgodne z instrukcją Ross 308 (2018). Kurczęta żywiono *ad libitum* mieszankami z komercyjnej wytwórni pasz (Polskie Zakłady Zbożowe, Wałcz, Polska): starter (od 1. do 12. dnia tuczu), grower I (od 13. do 22. dnia tuczu), grower II (od 23. do 32. dnia tuczu) i finisher (od 33. do 42. dnia tuczu). Doświadczenia przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Szczecinie (uchwała nr 19/2015 z dn. 22.05.2015).

Tabela 2. Charakterystyka przeprowadzonych doświadczeń na zwierzętach

Etap badań	Grupa	Liczba ptaków	Okres odchowu oraz rodzaj diety	
			1-21dzień	22- 42 dzień
Doświadczenie I	Kontrolna	100	Mieszanka paszowa + czysta woda	Mieszanka paszowa + czysta woda
	LEO <sub>0,2</sub>	100	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,2 ml/L	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,2 ml/L
	LEO <sub>0,4</sub>	100	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,4 ml/L	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,4 ml/L
Doświadczenie II	Kontrolna	100	Mieszanka paszowa + czysta woda	Mieszanka paszowa + czysta woda
	LEO <sub>1-42</sub>	100	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,4 ml/L woda	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,4 ml/L
	LEO <sub>22-42</sub>	100	Mieszanka paszowa + czysta woda	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,4 ml/L
Doświadczenie III	Kontrolna	100	Mieszanka paszowa + czysta woda	Mieszanka paszowa + czysta woda
	LEO <sub>1-42</sub>	100	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,4 ml/L	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,4 ml/L
	LEO <sub>22-42</sub>	100	Mieszanka paszowa + czysta woda	Mieszanka paszowa + woda zawierająca dodatek LEO w stężeniu 0,4 ml/L

### 5.2.2. Wskaźniki produkcyjne

Podczas doświadczeń ewidencjonowano masę ciała (**BW**) kurcząt brojlerów (w 1, 7, 14, 21, 28, 35 i 42 dniu życia), dzienne spożycie paszy (**FI**) i wody (**WI**) oraz liczbę ptaków padłych. Na podstawie uzyskanych wyników określono przyrosty masy kurcząt (**BWG**), konwersję paszy (**FCR**) oraz przeżywalność (**publikacja D-2, publikacja D-3, publikacja D-5**).

### 5.2.3. Wskaźniki surowicy krwi

W celu oznaczenia wskaźników biochemicznych, immunologicznych i antyoksydacyjnych, w 42. dniu odchowu pobrano krew z lewej żyły skrzydłowej od 10 losowo wybranych kurcząt z każdej grupy. Próbkę krwi odwirowano przez 5 minut przy 15000 obrotów/min w celu uzyskania surowicy. Do momentu rozpoczęcia analizy surowicę przechowywano w monitorowanych warunkach chłodniczych ( $+5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Temperatura próbek w czasie oznaczenia wynosiła  $+18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Analizę stężenia wskaźników biochemicznych krwi wykonano przy użyciu analizatora biochemicznego (VetTest 8008 firmy Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, USA) z wykorzystaniem technologii „suchej płytki” (**publikacja D-3, publikacja D-5**). Immunoglobuliny (IgA, IgG, IgM) oznaczono testem immunoenzymatycznym przy użyciu specyficznych przeciwciał dla kur firmy BETHYL (**publikacja D-5**). Oznaczenia wykonano przy pomocy czytnika fluorescencji, luminescencji i absorbancji Synergy, firmy Biotek (Hodek i Stiborova, 2003). Oznaczenie TAS wykonano w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

W celu określenia wskaźnika antyoksydacyjnego TAS (**publikacja D-5**) zastosowano test kolorymetryczny Randox, polegający na reakcji ABTS (2,2'-Azyno-di[3-etylobenzotiazoliny siarczanu]) z peroksydazą. Oznaczenia przeprowadzono przy użyciu analizatora biochemicznego Pentra 400 firmy Horiba ABX (Warszawa, Polska).

### 5.2.4. Analiza mikroflory jelita biodrowego

Oznaczenia składu treści jelita biodrowego (**publikacja D-3**) wykonano w Laboratorium Diagnostycznym „Labo-Wet” w Szczecinie. W 42. dniu życia ubito z każdej grupy po 10 kurcząt o masie zbliżonej do średniej w danej grupie. Od ubitych kurcząt pobrano próbki treści jelita biodrowego, które poddano badaniom mikrobiologicznym w kierunku wybranych grup drobnoustrojów. Mikroorganizmy oznaczano w 1 g treści jelita biodrowego, do którego dodawano 9 mL zbuforowanej wody peptonowej (Merck, Darmstadt, Niemcy), następnie

próbkę homogenizowano przez 2 minuty i poddawano kolejnym rozcieńczeniom. Badania mikrobiologiczne obejmowały oznaczenia następujących drobnoustrojów:

- a) bakterie ściśle beztlenowe – (PN-ISO 4833-1:2013-12) pożywka Schaedlera (BTL, Łódź, Polska) ( $+37 \pm 1^\circ\text{C}/ 5$  dni), uwzględnia bakterie ściśle beztlenowe (w tym *Clostridium*, probiotyczne *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) i bakterie względnie beztlenowe (w tym: pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, paciorkowce, gronkowce);
- b) bakterie probiotyczne – (ISO 20128:2006) pożywka MRS (BTL, Łódź, Polska) ( $+37 \pm 1^\circ\text{C}/ 5$  dni), uwzględnia *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*;
- c) bakterie tlenowe mezofilne – (PN-ISO 4833-1:2013-12) agar odżywczy (BTL, Łódź, Polska) ( $+30 \pm 1^\circ\text{C}/ 72$  h), uwzględnia bakterie względnie beztlenowe (w tym: pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, paciorkowce, gronkowce) i ściśle tlenowe (pałeczki *Pseudomonaceae*, laseczki *Bacillus*);
- d) *Escherichia coli* i *coliformy* – (PN-ISO 4833-1:2013-12) podłoże chromogenne ECC (Graso, Stargard Gdański, Polska) ( $+37 \pm 1^\circ\text{C}/ 72$  h);
- e) bakterie z *Clostridium* sp. redukujące siarczyny – pożywka płynna i stała według Wilsona – Blair'a ( $+37 \pm 1^\circ\text{C}/ 72$  h). Liczebności bakterii oznaczano metodą płytkową oraz probówkową – NPL (Najbardziej Prawdopodobna Liczba).

### 5.3. Statystyczna ocena wyników

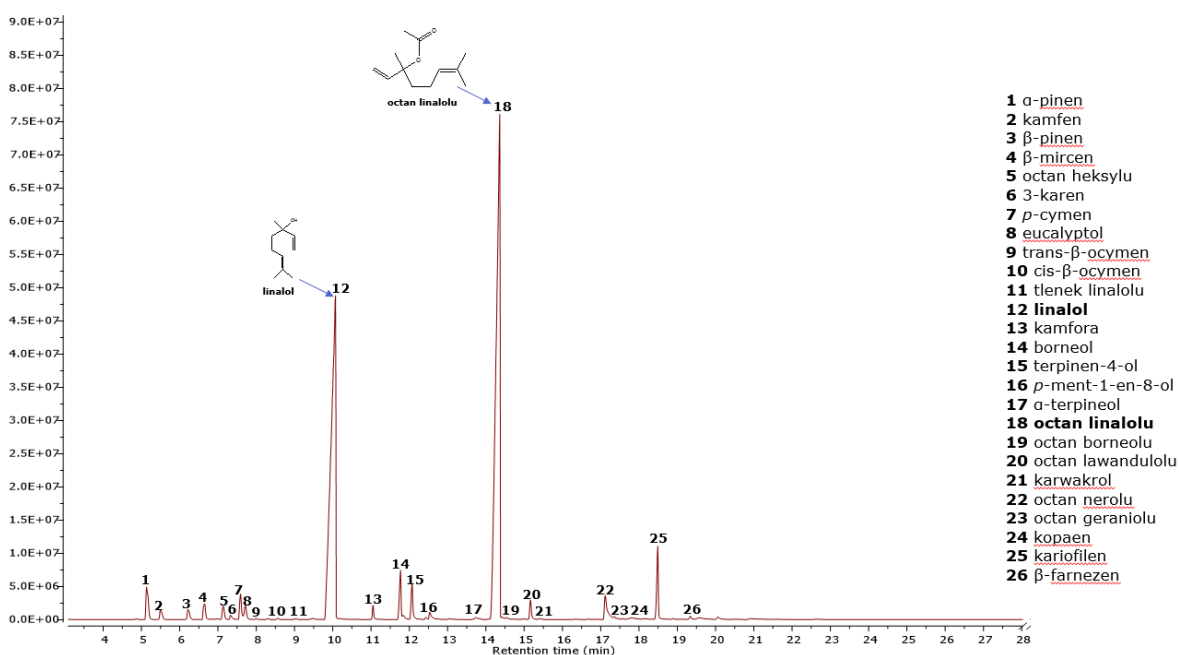
Uzyskane w doświadczeniu I wyniki (**publikacja D-2**) BW, FI, FCR, WI, WCR oraz stosunek spożycia wody do paszy opracowano statystycznie obliczając wartości średnie, błąd standardowy średniej (SEM) oraz wykonując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic między średnimi oceniono za pomocą testu post-hoc – zastosowano trend liniowy (1 – dawka 0 mL/L; 2 – dawka 0,2 mL/L; 3 – dawka 0,4 mL/L) i kwadratowy oraz test Tukeya. Przeżywalność w badanych grupach porównywano dokładnym testem Fishera. Za istotne przyjęto prawdopodobieństwo testowe na poziomie  $p < 0,05$  a za wysoce istotne przyjęto prawdopodobieństwo testowe na poziomie  $p < 0,01$ . W doświadczeniu II i III (**publikacja D-3**, **publikacja D-5**) wyniki opracowano statystycznie obliczając wartości średnie, błąd standardowy średniej (SEM) oraz wykonując dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla wskaźników produkcyjnych oraz jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla wskaźników surowicy krwi i oznaczenia składu mikrobiologicznego jelita biodrowego. Istotność różnic między średnimi oceniano z wykorzystaniem testu Tukeya. Przeżywalność

kurczą w badanych grupach porównywano dokładnym testem Fishera. Do obliczeń statystycznych użyto programu PQStat ver. 1.6.2 (PQStat Software, Polska).

## 6. Wyniki badań

### 6.1. Oznaczenie składu chemicznego olejku eterycznego metodą chromatografii gazowej z detektorem mas (GC-MS)

Skład chemiczny LEO przedstawiono w **publikacji D-2** oraz **publikacji D-3**. Zidentyfikowano 26 związków chemicznych, z których głównymi były octan linalolu (46,25%) i linalol (35,17%). W niższym stężeniu (< 5%) występowały: kariofilen,  $\alpha$ -pinen, borneol, octan nerolu, cis- $\beta$ -ocimen, *p*-cymen, octan lawandulolu, 4-terpineol. Analiza chromatograficzna wykazała, że względna zawartość poszczególnych klas związków w badanym olejku eterycznym kształtowała się następująco (%): węglowodory monoterpene (8,17), monoterpene utlenione (87,79), węglowodory seskwiterpene (2,93). Na rysunku 3 przedstawiono chromatogram z analizy składu chemicznego LEO.



Rysunek 3. Chromatogram GC-MS olejku eterycznego stosowanego w badaniach

### 6.2. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej

LEO wykazał właściwości przeciwutleniające, które rosły wraz ze wzrostem jego stężenia w próbce. Po 30 minutach inkubacji LEO neutralizował roztwór rodnika DPPH<sup>•</sup> na poziomie



4,11 – 79,51%, odpowiednio dla stężeń: 7,81 – 1000 µg/mL. Aktywność BHA, czyli substancji o udowodnionym działaniu przeciwutleniającym w tych samych stężeniach wynosiła odpowiednio: 4,18 – 99,21% (**publikacja D-5**).

### 6.3. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz szacowanie oddziaływania z antybiotykami

Wstępne wyniki wyznaczenia minimalnych stężeń hamujących MIC metodą mikrorozcieńczeń LEO przedstawiono w **publikacji D-2**. Badany olejek eteryczny charakteryzował się zróżnicowanym działaniem przeciwdrobnoustrojowym. Najbardziej wrażliwe na działanie LEO okazały się bakterie Gram-dodatnie – *S. aureus* ATCC 25923. Wzrost mikroorganizmów hamowany był przez LEO następująco (MIC % v/v): *S. aureus* ATCC 25923 (0,25); *S. pullorum* ATCC 13036 (0,50); *C. albicans* ATCC 10231 (0,625); *E. coli* ATCC 25922 (0,625); *S. enteritidis* ATCC 13076 (0,625); *S. aureus* MRSA/ORSA (0,625); *E. coli* [enro (-)] (1,0); *P. aeruginosa* (2,0); *S. typhimurium* ATCC 14028 (5,0). Badanie oddziaływania LEO w połączeniu z gentamycyną metodą *checkerboard* przedstawiono w **publikacji D-4**. Oddziaływanie synergistyczne wykazano wobec bakterii *S. aureus* ATCC 25923 (FICI – 0,192) oraz szczepu metycylooopornego *S. aureus* MRSA (FICI – 0,138), natomiast oddziaływanie addytywne oznaczono wobec bakterii *P. aeruginosa* (FICI – 0,70). W **publikacji D-5** omówiono interakcje po połączeniu LEO z enrofloksacyną wobec szczepów *E. coli*. Wykazano, że poszczególne interakcje LEO w połączeniu z enrofloksacyną były zróżnicowane, począwszy od tych wskazujących synergizm (*E. coli* 12 mm: FICI – 0,50; *E. coli* ≤ 6 mm: FICI – 0,22) po efekt addytywny (*E. coli* ATCC 25922: FICI – 0,66; *E. coli* 30 mm: FICI – 1,0; *E. coli* 21 mm: FICI – 0,75; *E. coli* 17 mm: FICI – 0,56).

### 6.4. Doświadczenia na zwierzętach – wskaźniki produkcyjne

We wszystkich doświadczeniach (**publikacja D-2, publikacja D-3, publikacja D-5**) BW jednodniowych kurcząt była wyrównana i wahała się w przedziale 40,2 – 45,6 g. W **doświadczeniu (publikacja D-2)** od 28. dnia życia ptaków do końca tuczu stwierdzono istotne statystycznie zwiększenie BW w grupach otrzymujących LEO, w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ). Dodanie LEO do wody pitnej zwiększyło końcową BW kurcząt bez względu na zastosowaną dawkę LEO ( $p < 0,01$ ). Nie odnotowano różnic między grupami w przypadku FI ( $p > 0,05$ ). Średnie dzienne FI kształtowało się na zbliżonym poziomie (0,10 kg/d/ptaka). Stwierdzono istotny wpływ dodatku LEO w stężeniu 0,4 mL/L na wskaźnik FCR ( $p < 0,01$ ). Zastosowanie dodatku LEO wpłynęło na FCR w drugim (22–42 d)

i całym okresie odchowu (1–42 d). Najwyższe FCR –1,63 (kg/kg), różniące się statystycznie ( $p < 0,05$ ) zaobserwowano w grupie kontrolnej, w której kurczętom podawano wodę bez dodatku LEO. FCR (kg/kg) za cały okres tuczu kształtowało się na poziomie (od 1,51 w grupie LEO<sub>0,4</sub> do 1,63 w grupie kontrolnej). Nie stwierdzono istotnych różnic między grupami w WI ( $p > 0,05$ ). Średnie dzienne WI za cały okres odchowu wyniosło około 0,22 L/ptaka we wszystkich grupach doświadczalnych. Wykazano natomiast istotne różnice w wykorzystaniu wody. WCR (L/kg) za cały okres tuczu kształtowało się na poziomie od 3,17 w grupie LEO<sub>0,4</sub> do 3,47 w grupie kontrolnej. W przeprowadzonym doświadczeniu przeżywalność kurcząt była porównywalna i wyniosła od 96% w grupie kontrolnej, do 99% w grupie LEO<sub>0,4</sub> ( $p > 0,05$ ). Zbliżone wyniki przedstawiono w **publikacji D-3** prezentującej **II doświadczenie na zwierzętach**. Od 28. dnia życia ptaków do końca tuczu stwierdzono istotne zwiększenie BW kurcząt z grup otrzymujących LEO w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,01$ ). Dodanie LEO do wody pitnej poprawiło końcową BW kurcząt bez względu na długość okresu stosowania. W całym okresie odchowu największe BWG odnotowano w grupie LEO<sub>1-42</sub> (2,88 kg) i LEO<sub>22-42</sub> (2,84 kg), natomiast najniższe w grupie kontrolnej (2,68 kg). Różnice w przyrostach wykazały statystyczną istotność ( $p < 0,01$ ). Nie odnotowano różnic między grupami w przypadku FI oraz WI ( $p > 0,05$ ). Średnie dzienne FI kształtowało się na zbliżonym poziomie – 0,11 kg/d/ptaka. Średnie dzienne WI (L/d/ptaka) za całego okresu tuczu wynosiło 0,22 we wszystkich grupach doświadczalnych. Zastosowanie LEO wpłynęło na FCR w drugim (22–42 d) i całym okresie odchowu (1–42 d). Najwyższe FCR, różniące się istotnie ( $p < 0,01$ ) zaobserwowano w grupie kontrolnej, w której kurczętom podawano wodę bez dodatku LEO. FCR (kg/kg) za cały okres tuczu kształtowało się na poziomie (od 1,57 w grupie LEO<sub>1-42</sub> do 1,74 w grupie kontrolnej). W przeprowadzonym doświadczeniu przeżywalność kurcząt była porównywalna i wyniosła od 96% w grupie kontrolnej do 99% w grupie LEO<sub>22-42</sub> ( $p > 0,05$ ). **W doświadczeniu III (publikacja D-5)** potwierdzono wcześniejsze wyniki badań. Dodanie LEO do wody pitnej poprawiło końcową BW ( $p < 0,01$ ), bez względu na długość okresu stosowania. W 42. dniu odchowu największą BW odnotowano w grupie LEO<sub>1-42</sub> (2,79 kg), natomiast najniższą w grupie kontrolnej (2,61 kg). Różnice w przyrostach wykazały statystyczną istotność w drugim (22–42 d) i całym (1–42 d) okresie odchowu ( $p < 0,01$ ). Nie odnotowano różnic między grupami w przypadku FI oraz WI ( $p > 0,05$ ). Dzielne FI kształtowało się na zbliżonym poziomie (0,1051 – 0,1061 kg/d/ptaka). Natomiast dziennie WI (L/d/ptaka) wynosiło od 0,219 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 0,229 w grupie kontrolnej. Zastosowanie LEO wpłynęło pozytywnie na FCR w drugim (22–42 d) i całym okresie odchowu (1–42 d). Najwyższe FCR ( $p < 0,01$ ) zaobserwowano w grupie kontrolnej, bez dodatku LEO. FCR (kg/kg) za cały okres tuczu

kształtował się na poziomie (od 1,62 w grupie LEO<sub>1-42</sub> do 1,72 w grupie kontrolnej). Przeżywalność kurcząt brojlerów była zbliżona w wszystkich grupach i wynosiła od 97% w grupie kontrolnej i grupie LEO<sub>1-42</sub> do 98% w grupie LEO<sub>22-42</sub> ( $p > 0,05$ ).

#### 6.5. Wskaźniki surowicy krwi

Wyniki oznaczenia wskaźników surowicy krwi zaprezentowano w **publikacji D-3** oraz **publikacji D-5**. W pierwszej z nich opisano wskaźniki biochemiczne surowicy krwi kurcząt uzyskane na koniec tuczu podczas **II doświadczenia** na zwierzętach. Stężenia (mmol/L) poszczególnych wskaźników kształtowały się następująco: cholesterol (od 3,57 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 3,67 w grupie kontrolnej), glukoza (od 12,83 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 13,5 w grupie kontrolnej), trójglicerydy (od 0,86 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 0,91 w grupie LEO<sub>1-42</sub>), kwas moczowy (od 0,25 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 0,32 w grupie LEO<sub>1-42</sub>). Analiza wariancji i test Tukey'a nie wykazały istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami kurcząt. W kolejnej **publikacji D-5** przedstawiono wyniki analizy wybranych wskaźników biochemicznych, immunologicznych i antyoksydacyjnych surowicy krwi w 42. dniu tuczu (**doświadczenie III**). Dodatek LEO do wody pitnej nie wpłynął istotnie na stężenie poszczególnych wskaźników biochemicznych, które kształtowało się następująco (mmol/L): cholesterol (od 3,07 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 3,49 w grupie LEO<sub>1-42</sub>), glukoza (od 10,34 w grupie LEO<sub>1-42</sub> do 10,82 w grupie kontrolnej), triglicerydy (od 0,54 w grupie kontrolnej do 0,63 w grupie LEO<sub>1-42</sub>). Stężenie kwasu moczowego ( $\mu\text{mol/L}$ ) wynosiło od 287,6 w grupie kontrolnej do 325,2 w grupie LEO<sub>1-42</sub>. Nie stwierdzono różnic w zawartości białka całkowitego w surowicy krwi, którego stężenie (g/L) mieściło się w granicach od 38,0 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 39,4 w grupie kontrolnej. Stężenie enzymów wątrobowych kształtowało się następująco (U/L): ALP (od 532,4 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 630,6 w grupie kontrolnej), ALT (od 19,4 w grupie kontrolnej do 20,60 w grupie LEO<sub>22-42</sub>), AST (od 307,8 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 509,6 w grupie kontrolnej). Nie stwierdzono istotnych różnic w przypadku wskaźników immunologicznych ( $p > 0,05$ ). Stężenie poszczególnych immunoglobulin wynosiło (mg/mL): IgG (od 10,21 w grupie kontrolnej do 12,40 w grupie LEO<sub>1-42</sub>), IgM (od 1,46 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 2,1 w grupie LEO<sub>1-42</sub>), IgA (od 0,7 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 0,79 w grupie kontrolnej). Jedynie, w przypadku wskaźnika antyoksydacyjnego – TAS wykazano istotne różnice ( $p < 0,01$ ). Surowica kurcząt otrzymujących wodę pitną z dodatkiem LEO bez względu na okres podawania, charakteryzowała się wyższym stężeniem TAS w porównaniu do grupy kontrolnej, który wynosił odpowiednio (mmol/L) od 1,55 (w grupie kontrolnej) do 2,26 (w grupie LEO<sub>1-42</sub>).

## 6.6. Skład mikroflory jelita biodrowego

Wyniki badań opartych na ilościowej analizie mikrobiologicznej mikroflory jelita biodrowego 42-dniowych kurcząt, przedstawiono w **publikacji D-3**. Ogólna liczba drobnoustrojów (JTK/g) w jelicie biodrowym kurcząt kształtowała się następująco: bakterie beztlenowe (od 7,42 w grupie kontrolnej do 7,96 w grupie LEO<sub>22-42</sub>), bakterie tlenowe mezofilne (5,30 w grupie LEO<sub>1-42</sub> i LEO<sub>22-42</sub> do 5,72 w grupie kontrolnej), *E. coli* (od 3,21 w grupie LEO<sub>22-42</sub> do 4,28 w grupie kontrolnej), coliformy (2,15 w grupie LEO<sub>1-42</sub> do 3,29 w grupie kontrolnej), bakterie probiotyczne (od 5,23 w grupie kontrolnej do 6,36 w grupie LEO<sub>1-42</sub>). Na podstawie wyników badań stwierdzono, że liczebność bakterii beztlenowych i tlenowych mezofilnych w treści jelita biodrowego kurcząt brojlerów była najwyższa i zbliżona we wszystkich grupach. Statystycznie istotne różnice stwierdzono w przypadku zmniejszenia liczebności coliform i *E. coli* w grupach LEO<sub>1-42</sub> i LEO<sub>22-42</sub> w porównaniu z grupą kontrolną oraz większej liczebności bakterii probiotycznych w tych grupach ( $p < 0,01$ ). W żadnej próbie nie wykryto obecności beztlenowych laseczek z grupy *Clostridium* sp.

## 7. Dyskusja wyników

Olejki eteryczne zawierają nawet do kilkuset związków chemicznych, głównie z grupy terpenoidów, dzielących się na monoterpenny, seskwiterpenny, diterpenny, triterpenny, tetraterpenny oraz politerpenny (**publikacja D-1**). Determinuje to ich wielokierunkowe działanie biologiczne, które w dość dużym stopniu warunkowane jest składnikiem dominującym. WykoLEO jest lotną mieszaniną związków organicznych, izolowaną z kwiatów *Lavandula angustifolia*. Zastosowana w badaniach technika GC-MS jest odpowiednim narzędziem do screeningu lotnych wtórnych metabolitów roślinnych. W badaniach własnych (**publikacja D-2**, **publikacja D-3**) najwyższym udziałem charakteryzowały się monoterpenny utlenione, do których należały linalol i octan linalolu. Należy podkreślić, że linalol jest związkiem o udowodnionej aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwutleniającej (Carrasco i in., 2016). LEO powinien spełniać wymogi normy ISO 3515:2002 lub farmakopei danego kraju. Według wymogów Farmakopei Europejskiej (Eur Ph 8.0, 2014) LEO powinien charakteryzować się następującą zawartością składników chemicznych: eukaliptol (< 2,5%), kamfora (< 1,2%), linalol (20,0 – 45,0%), octan linalolu (25,0 – 47,0%), 4-terpineol (0,1 – 8,0%), octan lawandulolu (> 0,1%),  $\alpha$ -terpineol (< 2,0%). Skład olejku zastosowanego w badaniach własnych był zgodny z wytycznymi farmakopei.

Interesującym zagadnieniem są właściwości antyoksydacyjne olejków eterycznych. Stosowane w produkcji drobiarskiej mogą ograniczać proces peroksydacji lipidów w mięśniach kurcząt rzeźnych. Mięśnie udowe są wrażliwe na procesy utleniania, ze względu na wyższą zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, których utlenianie skutkuje obecnością nadtlenków, oksysteroli czy dialdehydu malonowego (**publikacja D-1**). Z danych literaturowych wynika, że lotne metabolity roślinne oraz ich komponenty wykazują skuteczność w zapobieganiu utlenianiu lipidów, zbliżoną do  $\alpha$ -tokoferolu czy mieszaniny związków syntetycznych np. BHA (**publikacja D-1**). Wysoką efektywność w inhibicji utleniania emulsji tłuszczowych wykazano w przypadku olejków z tymianku (88,0%), rozmarynu (78,8%), szalwii (73,9%) czy lawendy (72,5%) (M'Hir i in., 2012; Amorati i in., 2013; Nehme i in., 2021). W badaniach własnych LEO wykazał właściwości przeciwutleniające, które rosły wraz ze wzrostem jego stężenia w próbce. Po 30 minutach inkubacji LEO neutralizował roztwór rodnika DPPH na poziomie 4,11 – 79,51%, odpowiednio dla stężeń: 7,81 – 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Aktywność BHA, czyli substancji o udowodnionym działaniu przeciwutleniającym w tych samych stężeniach wynosiła odpowiednio: 4,18 – 99,21% (**publikacja D-5**).

Działanie olejków eterycznych na organizm ptaków polega na zakwaszaniu treści jelitowej, działaniu przeciwdrobnoustrojowemu, przeciwutleniającemu, przeciwzapalnemu oraz immunostymulującemu (**publikacja D-1**). Olejki eteryczne poprzez oddziaływanie na system immunologiczny czy równowagę mikrobiologiczną układu pokarmowego, mogą wpływać także na przyrosty masy ciała kurcząt. Olejki mogą pobudzać apetyt czy działać jako stymulatory procesów trawiennych, poprawiając strawność i wchłanianie składników pokarmowych. Odpowiednio dobrane charakteryzują się działaniem przeciwbiegunkowym (Gopi i in., 2014). Obecnie w produkcji drobiarskiej badania koncentrują się na określeniu wpływu olejków eterycznych na: przyrosty masy ciała, efektywność wykorzystania paszy, zmniejszenie śmiertelności. Dodatkowo, olejki eteryczne mogą oddziaływać korzystnie na mikroflorę przewodu pokarmowego, dzięki czemu zwiększa się produkcja enzymów trawiennych (Zeng i in., 2015). Wyniki badań oceniających wpływ dodatku do diety olejków eterycznych na parametry produkcyjne kurcząt rzeźnych oraz kur niosek nie są jednoznaczne (Mokhari i in., 2018; Yarmohammadi Barbarestani i in., 2020; Torki i in., 2021). Wyniki badań własnych wskazują, że dodatek LEO miał istotny wpływ na końcową masę ciała kurcząt. Pozytywny wpływ dodatku LEO do wody pitnej (0,4 mL/L) na BW oraz FCR uzyskano w drugim (22–42 d) oraz całym okresie (1–42 d) stosowania LEO (**publikacja D-2, publikacja**

**D-3, publikacja D-5).** Podobne wyniki uzyskali Yarmohammadi Barbarestani i in. (2020), oceniający wpływ dodatku LEO (główne składniki chemiczne: linalol – 38,12%; octan linalolu – 25,79%) do paszy w stężeniu 600 mg/kg. W badaniu tym dowiedziono skuteczności oddziaływania na wzrost kurcząt, głównie poprzez poprawę równowagi mikroflory jelitowej, struktury nabłonka jelit i zdolności antyoksydacyjnej. Z kolei, Kūçūkyilmaz i in. (2012) podali, że zastosowanie w paszy EO z *Lavandula stoechas* (główne składniki chemiczne: karwakrol – 24,5%; 1,8-cineole – 20,1%) wywarło negatywny wpływ na BW, FI oraz FCR za cały okres odchowu. W badaniach Mokhtari i in. (2018) stwierdzono, że dodatek LEO (główne składniki chemiczne: linalol – 44,31%; octan linalolu – 32,98%) do paszy w stężeniu od 100 do 800 mg/kg nie miał wpływu na parametry produkcyjne tuczu, natomiast wykazano zmniejszenie masy mięśni piersiowych przy suplementacji w dawce 400 mg/kg paszy. Zróżnicowanie wyników badań może mieć związek ze stężeniem zastosowanej suplementacji, jej formą i sposobem podania (woda, pasza) oraz aktywnością biologiczną poszczególnych komponentów olejków eterycznych. Olejki eteryczne dzięki aktywności przeciw patogennym drobnoustrojom przyczyniają się do poprawy składu flory bakteryjnej w przewodzie pokarmowym (**publikacja D-1, publikacja D-3**). Według Mathlouthi i in. (2012) korzystny wpływ substancji czynnych z ziół na wskaźniki produkcyjne kurcząt brojlerów wynika z ich zdolności do stymulacji procesów trawiennych, absorpcji składników pokarmowych oraz modulowania układu odpornościowego organizmu. Mikroflora przewodu pokarmowego stanowi także istotny czynnik bezpieczeństwa konsumentów spożywających mięso drobiowe, ze względu na to, iż treść jelit może być źródłem zakażenia tuszek patogenami, m.in.: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* oraz *Salmonella* (Choi i in., 2015). Na skład jakościowy i ilościowy mikroflory jelit u drobiu wpływ ma wiele czynników, np.: stres środowiskowy, warunki i mikroklimat na fermie, wiek ptaków oraz skład paszy. Na homeostazę mikroflory układu pokarmowego można wpływać m.in. poprzez dodatek do diety odpowiednich substancji czynnych, którymi mogą być olejki eteryczne. W badaniach własnych istotnie statystycznie różnice między grupą kontrolną a grupami doświadczalnymi (LEO<sub>1-42</sub> i LEO<sub>22-42</sub>) stwierdzono w przypadku ogólnej liczby *Escherichia coli* i coliform (p < 0,01). Rezultat ten wskazuje, że LEO może stanowić właściwy naturalny dodatek w żywieniu drobiu, co jest szczególnie ważne, biorąc pod uwagę coraz większą oporność szczepu *E. coli* na chemioterapeutyki (Gadisa i in., 2019). Niektóre badania *in vivo*, których celem było zbadanie wpływu wybranych olejków eterycznych na kolonizację bakterii w różnych odcinkach jelit ptaków, potwierdziły jej zmniejszenie w przypadku *E. coli*, *C. perfringens* oraz grup *Enterococcus*, *Salmonella* czy *Staphylococcus* (Hong i in., 2012;

Vukić-Vranješ i in., 2013). Ponadto, poszczególne eksperymenty wykazały, że olejki eteryczne mogą wpływać dodatnio na liczebność bakterii fermentacji mlekowej (Kirkpinar i in., 2011; Erhan i in., 2012), co potwierdzono w badaniach własnych (**publikacja D-3**). W nielicznych przypadkach odnotowano jednakże działanie hamujące rozwój *Lactobacillus* (Tiihonen i in., 2010; Hong i in., 2012). Wpływ olejków eterycznych na układ pokarmowy poza zmniejszeniem liczby określonego rodzaju mikroorganizmów chorobotwórczych może być również związany z zakwaszeniem treści jelitowej (Gopi i in., 2013). Olejki eteryczne mogą także oddziaływać na morfologię jelit. Zmniejszenie liczby patogennych bakterii w jelitach może poprawiać zdolność komórek nabłonkowych do regeneracji kosmków jelitowych, a tym samym poprawiać zdolność wchłaniania składników pokarmowych (Zeng i in., 2015). Jednakże dane na ten temat są rozbieżne i dotyczą zarówno zwiększonej, jak i niezmięnionej długości kosmków w jelicie czczym i grubym brojlerów suplementowanych olejkami eterycznymi (Vukić-Vranješ i in., 2013; Khattak i in., 2014).

Parametry krwi uważane są za wskaźniki określające stan zdrowia organizmu. Są one pomocne nie tylko w diagnostyce chorób drobiu, ale także dostarczają ważnych informacji w badaniach immunologicznych oraz podczas oceny skuteczności terapii (Mohiti-Asli i Ghanaatparast-Rashti, 2017; Basit i in., 2020; Pham i in. 2020). Olejki eteryczne mogą być naturalnymi immunostymulatorami. Mathlouthi i in. (2012) podali, że olejki eteryczne i wyciągi z ziół mogą poprawić komórkową i humoralną odporność kurcząt brojlerów, zmniejszając ich podatność na choroby zakaźne. Pozytywny wpływ na stan zdrowotny mają również olejki eteryczne, wykazujące efekt hipocholesterolemiczny. Ponadto niektóre z nich mogą hamować aktywność enzymu wątrobowego (reduktaza HMG-CoA), regulującego ilość cholesterolu endogennego i obniżyć jego stężenie we krwi (Abo Ghanima i in., 2020). W dostępnej literaturze jest niewiele prac na temat wpływu LEO na wskaźniki biochemiczne, immunologiczne i antyoksydacyjne krwi. Badania własne wskaźników biochemicznych krwi kurcząt brojlerów wykazały brak istotnych różnic pomiędzy grupami (**publikacja D-3, publikacja D-5**). Wyniki te są zgodne z uzyskanymi przez Torki i in. (2021), którzy nie wykazali wpływu suplementacji LEO na parametry biochemiczne krwi u kur niosek. Podobnie Mokhari i in. (2018), stosując 100, 200, 400, 600 800 LEO (mg/kg) jako dodatek do paszy nie odnotowali różnic w ilości białka całkowitego, cholesterolu, triglicerydów, HDL, LDL oraz kwasu moczowego. Wykazali natomiast obniżenie stężenia glukozy w grupach kurcząt suplementowanych LEO, w stosunku do grupy kontrolnej. Z kolei, Yarmohammadi Barbarestania i in. (2020) oceniając zastosowanie LEO w żywieniu kurcząt brojlerów nie

stwierdzili różnic w stężeniu glukozy, białka całkowitego, triglicerydów, HDL, VLDL. Spośród badanych wskaźników biochemicznych istotne różnice odnotowali jedynie w poziomie cholesterolu – suplementacja 600 mg/kg LEO istotnie obniżyła jego poziom w porównaniu do grupy kontrolnej i grupy suplementowanej dawką 300 mg/kg LEO. Abo Ghanima i in. (2020) również stwierdzili obniżenie cholesterolu w krwi kur niosek suplementowanych paszą z dodatkiem olejku rozmarynowego i cynamonowego (300 mg/kg paszy). Ponadto cytowani autorzy, w grupach suplementowanych olejkami wykazali obniżenie stężenia enzymów ALT i AST. Niektóre olejki eteryczne i zawarte w nich związki chemiczne mają właściwości usprawniające system immunologiczny. W wyniku ich zastosowania w dietach zwiększa się odporność ptaków, a to w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia podatności na choroby zakaźne (Mohiti-Asli i Ghanaatparast-Rashti, 2017). Mohiti-Asli i Ghanaatparast-Rashti (2017) wykazali, że olejek z oregano w diecie kurcząt brojlerów w dawce 300 ppm znacznie zwiększył poziom immunoglobulin IgG, nie wpływając na wartość IgM. Podobnie Gao i in. (2020) podali, że badana przez nich mieszanina olejków eterycznych była silnym środkiem immunomodulującym, który podwyższał poziom immunoglobulin (IgG, IgM) u kur niosek. Mahrous i in. (2017) stwierdzili, że poziom immunoglobulin w surowicy (IgA, IgG i IgM) był istotnie ( $p < 0,05$ ) podwyższony u kurcząt brojlerów karmionych paszą z dodatkiem 1,0% i 1,5% olejku goździkowego. Badania własne wykazały, że aplikacja LEO do wody nie miała wpływu na poziom trzech opisanych u ptaków przeciwciał: IgA, IgM i IgG (**publikacja D-5**). Wyniki te są zgodne z wynikami innych badaczy, takich jak Aami-Azghadi i in. (2010), którzy wykazali, że włączenie do diety kurcząt EOs z kminku i piołunu w dawce 100, 200 i 300 ppm nie zwiększyło miana przeciwciał IgM i IgG. W badaniach Alp i in. (2012) również nie wykazano wpływu dodatku do diety olejku eterycznego z oregano na poziom IgG w surowicy krwi kurcząt po 42 dniach doświadczenia. Dokładny mechanizm, za pomocą którego olejki eteryczne stymulują odpowiedź immunologiczną u kurcząt brojlerów i innych zwierząt, jest nieznan, dlatego konieczne są dalsze badania nad możliwościami ich zastosowania w żywieniu. W badaniach własnych oceniano także całkowity status przeciwutleniający (TAS). Dodatek 0,4 mL/L LEO wpłynął istotnie ( $p < 0,01$ ) na wartość TAS (**publikacja D-5**). Wzrost TAS odnotowano w surowicy krwi kurcząt brojlerów otrzymujących LEO w pierwszym okresie odchowu (1-22 d) oraz przez cały jego okres (1-42 d), co potwierdza jego właściwości przeciwutleniające. Ryzner i in. (2013) również wykazali istotny wzrost TAS u kurcząt żywionych paszą z olejkiem eterycznym z *Satureja officinalis* w dawce 0,05%. TAS to zdolność organizmu do obrony przed działaniem wolnych rodników, polegająca na ich inaktywowaniu do substancji o obojętnym ładunku. Można przyjąć, że wartości TAS są



nieenzymatycznym markerem antyoksydacyjnym, który odzwierciedla całkowitą pojemność bariery antyoksydacyjnej danego organizmu, komórki, tkanki czy narządu. Wartości tego parametru mogą być również miarą równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej organizmu czy też wskaźnikiem wyczerpania rezerwy antyoksydacyjnej w przebiegu wielu chorób związanych z generacją wolnych rodników tlenowych, w tym kolibakteriozy. Kolibakterioza jest przyczyną dużych strat ekonomicznych w produkcji drobiarskiej. Zakażenia wywołane *E. coli* powodują wysoką zachorowalność i śmiertelność u drobiu (Fancher i in., 2020). Infekcje te są tradycyjnie leczone fluorochinolonami m.in. enrofloksacyną (Roth i in., 2019). Zastosowanie enrofloksacyny stało się punktem zwrotnym w leczeniu kolibakteriozy u drobiu, wywoływanej głównie serotypami *O1*, *O2*, *O18* i *O78* (Fancher i in., 2020) Chemioterapeutyki, pierwotnie bardzo skuteczne, w kontrolowaniu zakażenia *E. coli* po pewnym okresie stosowania, z powodu nabywanej przez bakterie oporności, stają się nieskuteczne. Z kolei, gentamycyna zaliczana jest do aminoglikozydów o silnym działaniu bakteriobójczym. Aminoglikozydy zaburzają proces biosyntezy białek, a ich działanie uzależnione jest od stężenia, wyższe stężenie leku powoduje wzrost aktywności bójczej, a przy niskich stężeniach można zaobserwować działanie bakteriostatyczne (Backer i Cooper, 2013). Aminoglikozydy stosowane są w leczeniu ludzi oraz u drobiu, pszczoł, bydła, świń, owiec, kóz, królików, wielbłądów i ryb. Są one skuteczne w przypadkach posocznicy oraz w chorobach zakaźnych przewodu pokarmowego, układów oddechowego i moczowego (Vaarten, 2012; Backer i Cooper, 2013). Należąca do tej grupy gentamycyna, znalazła zastosowanie w leczeniu zakażeń przyranych, wywoływanych głównie gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus*, opornym na  $\beta$ -laktamy (MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) oraz pałeczką rosy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* (wielolekoopornej). Od lat 80-tych ubiegłego stulecia nie udało się otrzymać nowych aminoglikozydów, które wykazywałyby dużą skuteczność przy stosunkowo małej toksyczności. Zahamowało to dalsze prace nad nowymi antybiotykami z tej grupy. Notowany wzrost częstości zakażeń bakteryjnych oraz oporności na stosowane leki zmusza do poszukiwania nowych rozwiązań, w celu poprawy skuteczności terapii (Munita i Ariasa, 2016). Obiecującym kierunkiem badań jest stosowanie olejków eterycznych w połączeniu z chemioterapeutykami. Zaletą łączenia substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym jest fakt, że olejki eteryczne oraz chemioterapeutyki są dopuszczone do stosowania u zwierząt – co stanowi przewagę nad nowo syntetyzowanymi związkami chemicznymi, których wprowadzenie na rynek wymaga długoterminowych badań oraz dużych nakładów finansowych. Działanie przeciwbakteryjne olejków eterycznych, w tym LEO zostało potwierdzone, jednakże jego oddziaływanie z syntetycznymi antybiotykami jest

słabo poznane (Adaszyńska i in., 2013; Moussaoui i Alaoui, 2016; Hossain i in., 2017; Ju i in., 2020). W badaniach własnych ocenę oddziaływania LEO w połączeniu z gentamycyną i enrofloksacyną przeprowadzono metodą *checkerboard* (**publikacja D-4, publikacja D-5**). Obliczone wartości FICI posłużyły do wykazania efektów ich wspólnego oddziaływania. Analizując poszczególne kombinacje gentamycyny z LEO (**publikacja D-4**) stwierdzono, że efekty ich połączenia na drobnoustroje były zróżnicowane, począwszy od tych wskazujących synergizm (*S. aureus* ATCC 25923: FICI – 0,192; *S. aureus* MRSA: FICI – 0,138) po efekt addytywny (*P. aeruginosa* ATCC 9027: FICI – 0,700). Istotny jest fakt, że uzyskano synergizm oddziaływania gentamycyny i LEO w stosunku do szczepu opornego (*S. aureus* MRSA). Inni autorzy przeprowadzając doświadczenia wykazali synergizm innych olejków eterycznych z gentamycyną, wobec bakterii gram dodatnich i gram ujemnych (Rosato i in., 2010; Yap i in., 2014; Moussaoui Alaoui, 2016; Ismail i in., 2017), co zostało potwierdzone w badaniach własnych w przypadku LEO, którego połączenia z gentamycyną nie były dotychczas badane (**publikacja D-4**). Wyniki badań oddziaływania enrofloksacyny w połączeniu z LEO również wykazały zróżnicowanie (**publikacja D-5**). Należy podkreślić, że uzyskano synergizm oddziaływania enrofloksacyny i LEO w stosunku do szczepów opornych *E. coli*. W żadnym przypadku nie stwierdzono oddziaływania antagonistycznego (**publikacja D-4, publikacja D-5**). El Atki i in. (2019) wykazali oddziaływanie synergistyczne olejku cytrynowego wobec *E. coli* ATCC 25922 w połączeniu z chloramfenikolem (FICI = 0,50). Inni autorzy przeprowadzając doświadczenia wykazali zróżnicowane oddziaływanie innych olejków eterycznych wobec szczepów *E. coli* (Talei i in., 2017; Wang i in., 2018; Gadisa i in., 2019). Potwierdzono to także w badaniach własnych w przypadku LEO, którego połączenia z enrofloksacyną nie były dotychczas badane. Występująca w ostatnich dekadach lekooporność wielu szczepów bakteryjnych, skłoniła współczesną medycynę i weterynarię do zastosowania skojarzonego leczenia. Działanie przeciwdrobnoustrojowe olejków eterycznych zostało empirycznie potwierdzone w wielu badaniach, ale sposób ich działania nie został do końca wyjaśniony (Fadli i in., 2012; Adaszyńska i in., 2013; Božik i in., 2018; Ju i in., 2020). Oddziaływanie synergistyczne może być skutkiem zmiany w przepuszczalności błony komórkowej bakterii. Udowodniono, że niektóre składniki olejków eterycznych, np. karwakrol występujący w dużej ilości (>30%) w olejku tymiankowym, charakteryzuje się zdolnością do permeabilizacji i depolaryzacji błony cytoplazmatycznej *E. coli*, ułatwiając w ten sposób przejście antybiotyku do komórki bakteryjnej (Fadli i in., 2012). Udowodniono, że olejki mogą wpływać zarówno na zewnętrzną powierzchnię komórki bakteryjnej, jak i cytoplazmę. Hydrofobowość, typowa dla olejków eterycznych powoduje rozrywanie struktur

bakteryjnych, prowadząc do zwiększonej przepuszczalności. Bariera przepuszczalności błony komórkowej jest nieodzowna dla wielu funkcji, w tym dla zachowywania statusu energetycznego komórki, transportu substancji rozpuszczonych czy regulacji metabolicznej. Wynika z tego, że mechanizmy przeciwdrobnoustrojowe olejków eterycznych mogą być związane z degradacją ściany komórkowej, koagulacją cytoplazmy; zwiększoną przepuszczalnością prowadzącą do wycieku zawartości komórki oraz redukcją siły protonomotorycznej (**publikacja D-1**; Božík i in., 2018). W nielicznych publikacjach pojawiły się doniesienia o większej aktywności przeciwbakteryjnej antybiotyków zastosowanych wraz z olejkami eterycznymi w badaniach *in vivo* (Ismail i in., 2017). Badania nad synergistycznym działaniem olejków eterycznych z antybiotykami wpisują się w strategię walki nad lekoopornością bakterii.

## 8. Wnioski

- Zastosowanie do wody pitnej dodatku LEO (0,4 mL/L) poprawiło wskaźniki produkcyjne kurcząt brojlerów, głównie poprzez zwiększenie BWG oraz zmniejszenie FCR.
- Suplementacja LEO nie wpłynęła na wskaźniki biochemiczne i immunologiczne krwi, podwyższyła natomiast poziom TAS, co świadczy o jego właściwościach antyoksydacyjnych.
- LEO charakteryzuje się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, modyfikującymi mikroflorę układu pokarmowego względem *Escherichia coli*, coliform.
- Włączenie LEO jako dodatku do wody pitnej dla kurcząt brojlerów może stanowić dobrą alternatywę dla niedozwolonych antybiotykowych stymulatorów wzrostu.
- Wśród badanych zestawień enrofloksacyny i gentamycyny w połączeniu z LEO stwierdzono występowanie dwóch typów oddziaływań: synergizmu i addytywności.

## 9. Literatura

- Abo Ghanima M.M., Elsadek M.F., Taha A.E., Abd El-Hack M.E., Alagawany M., Ahmed B.M., Elshafie M.M., El-Sabroun K. Effect of housing system and rosemary and cinnamon essential oils on layers performance, egg quality, haematological traits, blood chemistry, immunity, and antioxidant. *Animals* **2020**, 10, 245.
- Adaszyńska M., Swarczewicz M., Dziecioł, M., Dobrowolska A. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of lavender varieties from Poland. *Natural Product Research* **2013**, 27, 1497–1501.
- Aami-Azghadi M., Golian A., Kermanshahi H., Sedghi M. Comparison of dietary supplementation with cumin essential oil and prebiotic fermento on humoral immune response, blood metabolites and performance of broiler chickens. *Global Veterinaria* **2010**, 4, 380–387.
- Alp M., Midilli M., Kocabağlı N., Yilmaz H., Turan N., Gargili A., Acar N. The effects of dietary oregano essential oil on live performance, carcass yield, serum immunoglobulin G level, and oocyst count in broilers. *Journal of Applied Poultry Research* **2012**, 3, 630–636.
- Amorati R., Foti M.C., Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 20, 46, 10835–10847.
- Babushok V.I., Linstrom P.J., Zenkevich IG. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **2011**, 40, 4, 2–47.
- Backer B., Cooper M.A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ASC Chemical Biology* **2013**, 8, 105–115.
- Basit A.M., Kadir A.A., Loh T.C., Aziz S.A., Salleh A., Kaka U., Idris B.S. Effects of inclusion of different doses of *Persicaria odorata* leaf meal (POLM) in broiler chicken feed on biochemical and haematological blood indicators and liver histomorphological changes. *Animals* **2020**, 10, 1209.
- Božik M., Cejnar P., Maršík P., Klouček P. Data on low-molecular weight proteins of *Escherichia coli* treated by essential oils components, tetracycline, chlorine and peroxide by MALDI-TOF MS. *Data in Brief* **2018**, 21, 962–965.

- Brenes A., Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology* **2010**, 158, 1–14.
- Carrasco A.R., Martinez-Gutierrez V., Tomas K., Tudela J. *Lavandula angustifolia* and *Lavandula latifolia* essential oils from Spain: aromatic profile and bioactivities. *Planta Medica* **2016**, 82, 163–170.
- Choi K.Y., Lee T.K., Sul W.J. 2015. Metagenomic analysis of chicken gut microbiota for improving metabolism and health of chickens — a review. *Asian–Australasian Journal of Animal Science* **2015**, 28, 1217–1225.
- de Rapper S., Kamatou G., Viljoen A., van Vuuren S. The *in vitro* antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. *Evidence–Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**, 852049.
- de Rapper S., Viljonen A., van Vuren, S. The *in vitro* antimicrobial effects of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with conventional antimicrobial agents. *Evidence–Based Complementary and Alternative Medicine* **2016**, 2752739.
- El Atki Y., Aouam I., El Kamari F., Taroq A., Nayme K., Timinouni M., Lyoussi B., Abdellaoui A. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* **2019**, 10, 2, 63–67.
- Erhan M.K., Bolukbas S.C., Urusan H. Biological activities of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) in broilers. *Livestock Science* **2012**, 146, 189–192.
- European Pharmacopeia 8.0-8.8. (Eur Ph). 2014.
- Fadli M., Saad A., Sayadi S., Chevalier J., Mezrioui N.E., Pagès J.M., Hassani L. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* **2012**, 19, 464–471.
- Fancher C.A., Zhang L., Kiess A.S., Adhikari P.A., Dinh T.T.N., Sukumaran, A.T. Avian pathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*: challenges in no antibiotics ever broiler chicken production and potential solutions. *Microorganisms* **2020**, 8, 10, 1523.
- Gadisa E., Weldearegay G., Desta K. Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2019**, 19, 24.

- Gao J., Liu W., Geng B., Lei Q., Han H., Zhou Y., Liu J., Cao D., Li H., Li F. Effect of plant essential oil on growth performance and immune function during rearing period in laying hens. *Brazilian Journal of Poultry Science Revista Brasileira de Ciência Avícola* **2020**, 22, 001–010.
- Gopi M., Karthik K., Manjunathachar H.V., Tamilmahan P., Kesavan M., Dashprakash M., Balaraju B.L., Purushothaman M.R. Essential oils as a feed additive in poultry nutrition. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* **2014**, 2,1, 1–7.
- Hodek P., Stiborova M. Chicken antibodies – superior alternative to conventional immunoglobulins. **2003**. PROCEEDINGS-INDIAN NATIONAL SCIENCE ACADEMY PART B.
- Hong J.C., Steiner T., Aufy A., Lien T.F. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livestock Science* **2012**, 144, 253–262.
- Hossain S., Heo H., De Silva B.C.J., Wimalasena S.H.M.P., Pathriana H.N.K.S., Heo G.J. Antibacterial activity of essential oil from lavender (*Lavandula angustifolia*) against pet turtle-borne pathogenic bacteria. *Laboratory Animal Research* **2017**, 33, 195–201.
- Ismail M., Kemegne G.A., Njyou F.N., Penlap V., Mbacham W.F., Kamdem, S.L.S. Chemical composition, antibiotic promotion and *in vivo* toxicity of *Piper nigrum* and *Syzygium aromaticum* essential oil. *African Journal of Biochemistry Research* **2017**, 11, 58–71.
- ISO 20128:2006 – Oznaczenie liczby przypuszczalnych bakterii *Lactobacillus acidophilus* na pożywcę selektywnej — Technika liczenia kolonii w temperaturze 37 °C.
- Jafari B., Rezaie A., Ebadi A., Ghiamirad M., Ahmadizadeh C. Evaluation of medicinal plant oil (*Teucrium Polium*) in diets of broilers. *Journal of Applied Biological Sciences* **2011**, 12, 583–586.
- Ju J., Xie Y, Yu H., Guo Y., Cheng Y., Qian H., Yao W. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2020**, 19, 1–12.
- Kara N., Baydar H. Determination of lavender and lavandin cultivars (*Lavandula* sp.) containing high quality essential oil in Isparta, Turkey. *Turkish Journal of Field Crops* **2013**, 18, 58–65.

- Khattak, F., A. Ronchi, P. Castelli, and N. Sparks. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and carcass quality of broiler chickens. *Poultry Science* **2014**, 93,132–137.
- Kirkpinar F., UnuluH.B. Ozdemir G. Effect of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. *Livestock Science* **2011**, 137, 219–225.
- Küçükyılmaz K., Bozkurt M., Selek, N., Güven E., Eren H., Atasever A., Bintaş E., Çatl A., Çınar M. Effects of vaccination against coccidiosis, with and without a specific herbal essential oil blend, on performance, oocyst excretion and serum IBD titers of broilers reared on litter. *Italian Journal of Animal Science* **2012**, 11, 2012.
- Mahrous H.S., El-Far A.H., Sadek K.M., Abdel-Latif M.A. Effects of different levels of clove bud (*Syzygium aromaticum*) dietary supplementation on immunity, antioxidant status, and performance in broiler chickens. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* **2017**, 54, 29–39.
- Mathlouthi N., Bouzaienne T., Oueslati I., Recoquillay F., Hamdi M., Urdaci M., Bergaoui R. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: *in vitro* antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of Animal Science* **2012**, 90, 813–823.
- Moussaoui F., Alaoui F. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2016**, 6, 32–37.
- M'Hir S., Sifi S., Chammem N., Sifaoui I., Mejri A., Hamdi M., Abderrabba M., Antioxidant effect of essential oils of thymus, salvia and rosemarinus on the stability to oxidation of refined oils. *Annals of Biological Research* **2012**, 9, 4259–4263.
- Miguel M.G. Antioxidant and anti-inflammatory effect activities of essential oils: a short review. *Molecules* 2010, 15, 9252–9287.
- Mokhtari S., Rahati M., Seidavi A., Haq Q.M.I., Kadim I., Laudadio V., Tufarelli V. Effects of feed supplementation with lavender (*Lavandula angustifolia*) essence on growth performance, carcass traits, blood constituents and caecal microbiota of broiler chickens. *European Poultry Science* **2018**, 82.

- Mohiti-Asli, M.; Ghanaatparast-Rashti, M. Comparison of the effect of two phytogetic compounds on growth performance and immune response of broilers. *Journal of Applied Animal Research* **2017**, *45*, 1, 603–608.
- Munita J.M., Ariasa C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum* **2016**, *4*, 1–37.
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola L., De Feo V. (2013). Effect of essentials oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceutic*. 6: 1451–1474.
- Nehme R., Andrés S., Pereira R.B., Ben Jemaa M., Bouhallab S., Ceciliani F., López S., Rahali F.Z., Ksouri R., Pereira D.M., Abdennebi-Najar L. Essential oils in livestock: from health to food quality. *Antioxidants* **2021**, *10*, 2, 330.
- Paskudska, A.; Kołodziejczyk, D.; Socha, S. The use of herbs in animal nutrition. *Acta Sci. Pol. Zootechnica* **2018**, *17*, 3–14.
- Pham V.H., Kan L., Huang J., Geng Y., Zhen W., Guo Y., Abbas W., Wang Z. Dietary encapsulated essential oils and organic acids mixture improves gut health in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **2020**, *11*, 18.
- PN-ISO 4833-1:2013-12 – Mikrobiologia łańcucha żywnościowego -- Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów - Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu wgłębnego w temperaturze 30 stopni C.
- PN-ISO 3515:2004 – Olejek lawendowy (*Lavandula angustifolia*).
- PN/IEC 17025:2005 – Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
- PN-EN ISO/IEC 17025:2005 – Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
- Prusinowska R. Śmigielski K., Stobiecka A., Kunicka-Styczyńska A. Hydrolates from lavender (*Lavandula angustifolia*) – their chemical composition as well as aromatic, antimicrobial and antioxidant properties. *Natural Product Research* **2016**, *30*, 4, 386–393.
- Ross Broiler Management Handbook, **2018**. <https://en.aviagen.com/tech-center/>
- Rosato A., Piarulli M., Corbo F., Muraglia M., Carone, A., Vitali M.E., Vitali C. *In vitro* synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, *17*, 3289–3295.



- Roth N., Käsbohrer A., Mayrhofer S., Zitz U., Hofacre Ch., Domig K.J. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science* **2019**, 98, 4, 1791–1804.
- Roofchae A., Mehrdad I., Ebrahimzadeh M.A., Akbari M.R. Effect of dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens. *African Journal of Biotechnology* **2011**, 32, 6177–6183.
- Ryzner M., Takáčová J., Čobanová K., Plachá I., Venglovská K., Faix S. Effect of dietary *Salvia officinalis* essential oil and sodium selenite supplementation on antioxidative status and blood phagocytic activity in broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno* **2013**, 82, 43–48.
- Sander G., Heckmann M., Weghuber J. Immunomodulatory activities of selected essential oils. *Biomolecules* **2020**, 10, 1139–1145.
- Sassi B.N., Averós X., Estevez I. Technology and poultry welfare. *Animals* **2016**, 10, 62.
- Shafaghat A., Salimi F., Amani-Hooshyar V. Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganism. *Journal of Medicinal Plants Research* **2012**, 6, 3, 455–460.
- Talei G.R., Mohammadi M., Bahmani M., Kopaei M.R. Synergistic effect of *Carum copticum* and *Mentha piperita* essential oils with ciprofloxacin, vancomycin, and gentamicin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* **2017**, 2, 82–87.
- Tiihonen K.H., Kettunen M.L., Bento M., Saarinen S., Lahtinen A.C., Ouwehand H., Schulze N., Rautonen N. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *British Poultry Science* **2010**, 3, 381–392.
- Torki M., Mohebbifar A., Mohammadi H. Effects of supplementing hen diet with *Lavandula angustifolia* and/or *Mentha spicata* essential oils on production performance, egg quality and blood variables of laying hens. *Veterinary Medicine and Science* **2021**, 7, 184–193.
- Wang Y., Kong L., Liu J., Ma H. Synergistic effect of eugenol with Colistin against clinical isolated Colistin-resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Resistant & Infection Control* **2018**, 7, 17.

- Wells R., Truong F., Adal A.M., Sarker L.S., Mahmoud S.S. *Lavandula* essential oils: a current review of applications in medicinal, food, and cosmetic industries of lavender. *Natural Product Communications* **2018**, 13, 1403–1417.
- Vaarten J. Clinical impact of antimicrobial resistance in animals. *International Office of Epizootics* **2012**, 31, 221–230.
- Van Vuuren S., Viljoen A. Plant-based antimicrobial studies. Methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica* **2011**, 77, 1168–1182.
- Venkitanarayanan K., Kollanoor-Johny A., Darre M.J., Donoghue A.M., Donoghue D.J. Use of plant-derived antimicrobials for improving the safety of poultry products. *Poultry Science* **2013**, 2, 493–501.
- Vukić-Vranješ N., Tolimir D., Vukmirović R., Čolović V., Stanačev P., Ikončić S. Effect of phyto-genic additives on performance, morphology and caecal microflora of broiler chicken. *Biotechnology in Animal Husbandry* **2013**, 2, 311–319.
- Yap P.S., Yiap B.C., Ping H.C., Lim S.H. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal* **2014**, 8, 6–14.
- Yarmohammadi Barbarestania S., Jazib V., Mohebodinic H., Ashayerizadehb A., Shabanib A., Toghyani M. Effects of dietary lavender essential oil on growth performance, intestinal function, and antioxidant status of broiler chickens. *Livestock Science* **2020**, 233, 103958.
- Zeng Z., Zhang S., Wang H., Paio X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **2015**, 6, 7–15.
- Zheng A., Lin S., Pirzado S.A., Chen Z., Chang W., Cai H., Liu G. Stress associated with simulated transport, changes serum biochemistry, postmortem muscle metabolism, and meat quality of broilers. *Animals* **2020**, 10, 1442.
- Zhao Q., Bowles E.J., Zhanga H. Antioxidant activities of eleven Australian essential oils. *Natural Product Communications* **2008**, 3, 837–842.

# 10. Załączniki