

# Antimikrobielle *in-vitro*-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachentupferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmänn<sup>1</sup>, D. Bismarck<sup>2</sup>, O. J. Glardon<sup>4</sup>, M. Meylan<sup>3</sup>, J. Becker<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern; <sup>2</sup>LABOKLIN GmbH & Co KG, Bad Kissingen;

<sup>3</sup>Wiederkäuferklinik, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern; <sup>4</sup>Cabinet vétérinaire des Jordils, Yverdon-les-Bains

## Zusammenfassung

Ätherische Öle sind sekundäre Metaboliten aromatischer Pflanzen und werden in der Phytotherapie zur Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen eingesetzt. In der vorliegenden Studie wurden acht ausgewählte ätherische Öle – Ajowanöl (*Trachyspermum ammi* L.), Fenchelöl (*Foeniculum vulgare* Mill. *subsp. vulgare* var. *vulgare*), Thymianöl chemotyp (ct.) thymol (*Thymus vulgaris* L.), Teebaumöl (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), Oreganoöl (*Origanum vulgare* L.), Bergbohnenkrautöl (*Satureja montana* L.), Lemongrasöl (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) und Eukalyptusöl (*Eucalyptus globulus* Labill.) – mittels Agardiffusion und Mikrodilution auf ihre antibakterielle Wirkung gegenüber *Pasteurella* (*P.*) *multocida*- und *Mannheimia* (*M.*) *haemolytica*-Isolaten aus tiefen Nasenrachentupferproben von Mastkälbern untersucht.

Alle acht ätherischen Öle zeigten sich gegenüber den getesteten Isolaten wirksam. Lemongrasöl erwies sich als das potenteste aller acht ätherischen Öle, wobei Fenchelöl hingegen nur schwach wirksam war. Unterschiedliche Wirkungen wurden zwischen den beiden angewandten Untersuchungsmethoden beobachtet. Beispielsweise war die Wirksamkeit von Ajowan-, Thymian-, Oregano- und Bergbohnenkrautöl in der Agardiffusion vergleichbar. Dies konnte jedoch mit dem Verfahren der Mikrodilution nicht reproduziert werden. *P. multocida* erwies sich gegenüber allen getesteten ätherischen Ölen empfindlicher als *M. haemolytica*.

Diese Untersuchung zeigt erstens, dass die getesteten ätherischen Öle *in vitro* eine antimikrobielle Wirksamkeit auf klinische *P. multocida*- und *M. haemolytica*-Isolate haben. Zweitens zeigt sie, dass die Untersuchungsmethode mit dem Testergebnis assoziiert ist.

**Schlüsselwörter:** Agardiffusion, Aromatogramm, ätherische Öle, *Mannheimia haemolytica*, Mikrodilution, *Pasteurella multocida*

## Antimicrobial *in vitro* effects of eight essential oils on *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* from nasopharyngeal swab samples of fattening calves

Essential oils are secondary metabolites of aromatic plants and are used in phytotherapy to treat various diseases. In the present study, eight selected essential oils - ajwain oil (*Trachyspermum ammi* L.), fennel oil (*Foeniculum vulgare* Mill. *subsp. vulgare* var. *vulgare*), thyme oil chemotype (ct.) thymol (*Thymus vulgaris* L.), tea tree oil (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), oregano oil (*Origanum vulgare* L.), mountain savory oil (*Satureja montana* L.), lemongrass oil (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) and eucalyptus oil (*Eucalyptus globulus* Labill.) - were examined for their antibacterial effect against *Pasteurella* (*P.*) *multocida* and *Mannheimia* (*M.*) *haemolytica* isolates from deep nasopharyngeal swab samples of fattening calves using agar diffusion and microdilution.

All eight essential oils were effective against the tested isolates. Lemongrass oil proved to be the most potent of all eight essential oils, while fennel oil was only weakly effective. Different antimicrobial effects were observed between the two research methods. The effectiveness of ajwain, thyme, oregano and mountain savory oils was comparable in agar diffusion. However, this could not be reproduced using the microdilution method. *P. multocida* was found to be more sensitive to all essential oils tested than *M. haemolytica*.

This study shows that the tested essential oils have antimicrobial *in-vitro* effects on *P. multocida* and *M. haemolytica* isolates and that the examination method is associated with the test result.

**Keywords:** Agar diffusion, aromatoqram, essential oils, *Mannheimia haemolytica*, microdilution, *Pasteurella multocida*

<https://doi.org/10.17236/sat00429>

Eingereicht: 22.04.2024  
Angenommen: 14.06.2024

Antimikrobielle  
in-vitro-Wirkung acht  
ätherischer Öle auf  
*Pasteurella multocida*  
und *Mannheimia*  
*haemolytica* aus  
Nasenrachentupferproben  
von Mastkälbern

B. A. Salzmann,  
D. Bismarck, O. J. Glardon,  
M. Meylan, J. Becker

## Einleitung

Ätherische Öle (ÄÖ) sind sekundäre Metaboliten in ungefähr 300 Pflanzenfamilien und schützen diese unter anderem vor Schäden durch Mikroorganismen oder Insekten; sie können auch Herbivoren davon abhalten, die Pflanze zu fressen.<sup>6</sup> Meist werden ÄÖ durch Wasserdampfdestillation aus verschiedenen Teilen einer Pflanze gewonnen.<sup>27</sup> Ätherische Öle sind extreme Vielstoffgemische, die aus bis zu 200 oder mehr verschiedenen, meist flüchtigen Komponenten zusammengesetzt sein können, wobei häufig ein Anteil einer einzelnen oder weniger Komponenten dominiert (Tabelle 1).<sup>54,60</sup> Sie bestehen aus Mono-, Sesqui- und Diterpenen und deren Verbindungen. Im Gegensatz dazu sind fette Öle Wenigstoff-Systeme, die im pflanzlichen Primärstoffwechsel als Energielieferant gebildet werden und sich hauptsächlich aus Glycerinestern von Fettsäuren zusammensetzen. Ätherische Öle verfügen aufgrund ihrer komplexen, aus einzelnen pharmakologisch wirksamen Bestandteilen zusammengesetzten Struktur über bakterizide, antivirale, fungizide und antioxidative Wirkungen und wurden bereits früh in der Menschheitsgeschichte therapeutisch eingesetzt.<sup>62</sup>

Diese Öle können inhaliert werden. In der Humanmedizin gilt die Inhalation ätherischer Öle als eine sichere und zuverlässige Anwendung bei bronchopulmonalen Erkrankungen.<sup>58</sup>

Auch in der Tiermedizin wird eine inhalative Therapie bei respiratorischen Problemen empfohlen.<sup>16</sup> Eine neue Studie beschreibt eine Verschiebung der nasopharyngealen Mikrobiota, inkl. eines Kurzzeiteffektes auf das Vorkommen von *Mannheimia haemolytica* bei einmaliger Anwendung eines intranasal verabreichten ÄÖ-Sprays (Ajowan-, Thymian-, Fenchel-, Citronella-, Zimtblätteröl, je 0,025 %) ohne Nebenwirkungen.<sup>38</sup>

Bei der Inhalation gelangen Bestandteile ÄÖ in die Lunge und wirken auf vorhandene Krankheitserreger und die Bronchialschleimhaut. Ihre antibakterielle Wirkung als auch ihre Wirkung auf Körperzellen können die ÄÖ über apolare Wechselwirkungen mit der Zellwand/-membran entfalten und werden hier aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften in die Lipidbereiche eingelagert. Meist werden bei der inhalativen Anwendung von ÄÖ höhere Konzentrationen in der Gasphase erreicht, als für die Entfaltung der antibakteriellen Wirkung nötig ist.<sup>58</sup>

Die Wirkung auf die Bronchialschleimhaut ist bei niedrigen Ölkonzentrationen relativ spezifisch, da je nach Molekülgröße und Komponente eine Einlagerung in Membranen bevorzugter Zelltypen oder bestimmter Domänen der Membran stattfindet. So reagieren Drüsenzellen der Bronchialschleimhaut meist mit einer gesteigerten Sekretion dünnflüssigen Sekrets und die Zilien mit erhöhter Schlag-

frequenz.<sup>58</sup> Bei der praktischen Anwendung sollten ÄÖ auch bei der Inhalation stets nur verdünnt angewandt werden um z.B. Nebenwirkungen wie Reizungen der Schleimhäute zu vermeiden. In der Humanmedizin gibt es Dosierungsangaben und Rezepturen von ÄÖ-Mischungen für unterschiedliche Erkrankungssymptome des Respirationstraktes.<sup>62</sup> In der Veterinärmedizin ist ihr Einsatz nicht weit verbreitet und beruht hauptsächlich auf empirischen Daten.<sup>16,47</sup> Für die Veterinärmedizin relevante Bakterien wurden nur in wenigen Studien untersucht.<sup>13,41,56</sup> In Ermangelung offizieller, international angewandeter Richtlinien und Interpretationskriterien fusst die Auswertung von Wirksamkeitstests von ÄÖ auf relevante Keime auf individuell festgelegten Masszahlen oder Referenzen. Ausserdem werden häufig Referenzkeime als standardisiertes Testobjekt herangezogen, statt im Feld zirkulierende Keime zu verwenden. Dementsprechend besteht Bedarf an weiteren wissenschaftlichen Studien.<sup>5</sup>

Ein im Moment an Wichtigkeit gewinnendes Forschungsgebiet ist die Bekämpfung von Biofilmen.<sup>26</sup> Dabei zeigten ÄÖ und ihre Einzelkomponenten *in vitro* Wirkung gegen die Bildung von Biofilmen von *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*.<sup>30,31,42</sup> Von besonderem Interesse ist jedoch die antibakterielle Wirkung von ÄÖ im Zusammenhang mit bakteriellen Antibiotikaresistenzen.<sup>46,57</sup> Ätherische Öle wirken gleichermaßen auf antibiotikaresistente und sensible Keime.<sup>13,18,43</sup>

In der vorliegenden Studie wurden klinische Isolate von *Pasteurella (P.) multocida* und *Mannheimia (M.) haemolytica* aus tiefen Nasenrachentupferproben von Schweizer Mastkälbern untersucht. Beide Bakterien haben eine wichtige Bedeutung als opportunistische Keime bei der Entstehung von Lungenerkrankungen.<sup>52</sup> Gerade bei Kälbern haben Respirationserkrankungen eine grosse Bedeutung.<sup>9,35,36,45,48</sup> Bisweilen werden ÄÖ in der Nutztierpraxis gegen Atemwegserkrankungen eingesetzt. Dazu gehören beispielsweise Öle aus den Pflanzen Thymian, Eukalyptus, Oregano und Teebaum.<sup>14,15</sup> Eukalyptusöl wird vor allem wegen seiner antiinflammatorischen Wirkung eingesetzt.<sup>62</sup> Auch für trans-Anethol, eine Hauptkomponente von Fenchelöl, konnte an Mäusen mit dem Acute Respiratory Distress Syndrom eine entzündungshemmende Wirkung beobachtet werden.<sup>63</sup> *In vitro* wurde eine antibakterielle Wirkung für Ajowanöl und Thymianöl und dessen volatilen Komponenten gegen *P. multocida*, *M. haemolytica* und *Histophilus somni* aufgezeigt.<sup>3</sup>

Um den Erfolg einer Therapie mit ÄÖ im Tier abzuschätzen, können sie im Vorhinein *in vitro* auf ihre Wirksamkeit gegen das entsprechende Isolat getestet werden.<sup>53</sup> Die dazugehörige Methode, die routinemässig von Labors angeboten wird, ist das Aromatogramm.<sup>20</sup> Es handelt sich dabei um einen Agardiffusionstest, wobei das zu testende ÄÖ in Form eines getränkten Filterplättchens auf eine mit dem betref-

fenden Keim beimpfte Agarplatte aufgebracht wird. Die Wirkung wird nach Inkubation anhand der Grösse des Hemmhofradius abgelesen (Abbildung 1). Zusätzlich wurde in der vorliegenden Studie eine weitere, aufwendigere Methode, die Mikrodilution, hinzugezogen. Hier werden in einer seriellen Verdünnungsreihe mehrere Ölkonzentrationen in einem flüssigen Nährmedium gegen bakterielle Erreger getestet. Diese Methode erlaubt den Kontakt aller Wirkkomponenten des ÄÖ mit dem Keim. Dies ermöglicht die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).

Ziel der vorliegenden Studie war es, acht ÄÖ auf ihre antibakterielle Wirkung gegenüber *P. multocida*- und *M. haemolytica*-Isolate mittels Agardiffusion und Mikrodilution zu testen. Die Hypothese lautet: ÄÖ wirken *in vitro* gegen *P. multocida* und *M. haemolytica* aus tiefen Nasenrachen-tupferproben von Schweizer Mastkälbern.

## Material und Methoden

### Ätherische Öle

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Aromatogramme mit den folgenden ÄÖ durchgeführt: Ajowanöl (*Trachyspermum ammi* L.), Fenchelöl (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare* var. *vulgare*), Thymianöl (ct. thymol (*Thymus vulgaris* L.)), Teebaumöl (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), Oreganoöl (*Origanum vulgare* L.), Bergbohnenkrautöl (*Satureja montana* L.), Lemongrasöl (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) und Eukalyptusöl (*Eucalyptus globulus* Labill.).

Oregano-, Lemongras-, Bergbohnenkraut- und Eukalyptusöl wurden von TAOASIS® GmbH (Dahlbrede 3, D-32758 Detmold, Deutschland), Thymian-, Fenchel- und Teebaumöl von PRIMAVERA® (Naturparadies 1, D-87466 Oy-Mittelberg, Deutschland) und Ajowanöl von Oshadhi (Schwanenstrasse 15, D-77815 Bühl, Deutschland) bezogen.

### Bakterien-Isolate

Die getesteten Keimisolate stammten aus tiefen Nasenrachen-tupferproben von Mastkälbern, welche im Rahmen des Projekts «Freiluftkalb» der Wiederkäuferklinik der Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, isoliert wurden.<sup>12</sup> Insgesamt waren dort 3551 Tupferproben entnommen worden, aus welchen am Institut für Veterinär bakteriologie der Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, unter anderem 1603 *P. multocida* und 450 *M. haemolytica* isoliert wurden.<sup>8,10</sup> Die Isolate wurden in 30 % Glycerol-Stocks bei -80°C aufbewahrt. Aus allen *Pasteurellaceae* wurden 200 zufällig gewählte Isolate für eine Überprüfung der Wirksamkeit von ÄÖ an LABOKLIN GmbH, Bad-Kissingen übergeben. Hier erfolgte eine Anzucht auf Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (BD Columbia Agar with 5 % Sheep Blood, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) mit anschliessender Lagerung bei -20 mittels Cryobank™ (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld) bis zur Durchführung weiterer Untersuchungen. Daraus wurden 20 *P. multocida*- und 20 *M. haemolytica*-Isolate zufällig ausgewählt. Vor der Untersuchung wurden die Isolate auf Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (BD Columbia Agar with 5 % Sheep Blood, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) bei 36±1°C angezüchtet. Für die Versuche wurden 24 Stunden alte Kolonien verwendet.

Antimikrobielle in-vitro-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachen-tupferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmann,  
D. Bismarck, O. J. Glardon,  
M. Meylan, J. Becker

**Tabelle 1:** Prozentualer Anteil ausgewählter Komponenten der getesteten ätherischen Öle in Aromatogrammen tiefer Nasenrachen-tupferproben Schweizer Mastkälber gegen *P. multocida* und *M. haemolytica* (Gaschromatografie, vorgelegt von den jeweiligen Herstellern).

Komponenten (%)	Ajowanöl	Fenchelöl	Thymianöl	Teebaumöl	Oreganoöl	Bergbohnenkrautöl	Lemongrasöl	Eukalyptusöl
<b>Monoterpene</b>								
<i>alpha</i> -Terpinen	–	–	1,71	9,49	–	–	–	–
<i>gamma</i> -Terpinen	43,32	0,97	10,86	20,26	–	11,24	–	–
<i>para</i> -Cymol	23,69	0,31	–	2,63	13,2	16,4	–	1,25
<i>beta</i> -Cymol	–	–	18,76	–	–	–	–	–
<i>alpha</i> -Pinen	–	14,43	1,41	2,52	–	–	–	17,05
<i>alpha</i> -Phellandren	0,06	10,79	0,21	0,44	–	–	–	0,27
<b>1,8-Cineol (Eucalyptol)</b>	–	–	0,58	1,08	–	0,6	–	62,04
<i>Terpinen-4-ol</i>	0,05	–	0,82	40,39	0,51	–	–	4,7
<i>Geraniol</i>	–	–	–	–	–	–	9,42	–
<b>Citral (Geranial + Neral)</b>	–	–	–	–	–	–	68,71	–
<i>Fenchon</i>	–	12,69	–	–	–	–	–	–
<i>Thymol</i>	25,25	–	44,95	–	2,65	5,77	–	–
<i>Carvacrol</i>	0,17	–	3,36	–	61,69	42,03	–	–
<b>Phenylpropanoide</b>								
<i>trans</i> -Anethol	–	50,89	–	–	–	–	–	–
<i>Estragol</i>	–	2,13	–	–	–	–	–	–

Antimikrobielle  
in-vitro-Wirkung acht  
ätherischer Öle auf  
*Pasteurella multocida*  
und *Mannheimia*  
*haemolytica* aus  
Nasenrachentupferproben  
von Mastkälbern

B. A. Salzmann,  
D. Bismarck, O. J. Glardon,  
M. Meylan, J. Becker

## In-vitro-Methoden

### Agardiffusion

Für den Agardiffusionstest wurde in steriler NaCl-Lösung (0,9 %, pH 5,7–5,8) eine Bakteriensuspension hergestellt und mit dem Densitometer (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland) auf 0,5 McFarland, eingestellt. Aus der Bakteriensuspension wurden 100 µl auf eine Müller-Hinton-Agarplatte mit 5 % Schafblut (BD Mueller Hinton II with 5 % Sheep Blood, Becton Dickinson, Heidelberg) gegeben und mit einem Spatel ausplattiert. In die Mitte der Agarplatten wurde jeweils ein Filterpapierplättchen mit 6 mm Durchmesser (BBL<sup>®</sup> Sensi-Disc<sup>®</sup> Susceptibility Test Disc, Blanc Disc, Becton Dickinson, Heidelberg) platziert, das anschliessend mit 10 µl des zu testenden ÄÖ beschickt wurde. Pro Platte wurde jeweils ein ÄÖ getestet, um Interaktionen zwischen den Ölen zu vermeiden.<sup>12,13</sup> Danach wurden die Agarplatten bei Zimmertemperatur für 30 Minuten mit dem Filterpapierplättchen inkubiert, um eine Diffusion der ÄÖ in den Agar zu ermöglichen. Die darauffolgende Inkubation (für 24 h bei 36 ± 1 °C) initiierte das Keimwachstum. Die Hemmhofradien wurden manuell in Millimeter gemessen (Abbildung 1). Eine Wachstumskontrolle ohne ÄÖ wurde mitgeführt.<sup>13</sup>

Die Agardiffusion mit *P. multocida* (n=20) und *M. haemolytica* (n=20) wurde für jedes der acht verwendeten ÄÖ im Duplikat durchgeführt. Inhomogen gewachsene oder kontaminierte Bakterienrasen wurden verworfen und der Ausstrich wurde wiederholt.

### Mikrodilution

Die Mikrodilution wurde in 96-Well-Platten (Mikrotiterplatten U-Form 96-Fach, Engelbrecht Medizin- und Labor-

technik GmbH, Endermünde, Deutschland) wie bei Cermelli et al (2008) beschrieben durchgeführt.<sup>17</sup> Als Flüssignährmedium wurde Wilkins-Chalgren Bouillon (WCB, Wilkins-Chalgren Anaerob Broth, Lot: 2451246, Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, UK, 500 g/15,1 L) verwendet. Zur Bouillon wurde der Emulgator Polysorbat 20 (1 %, Tween20<sup>®</sup>, CAS-No. 9005-64-5, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben, um eine adäquate Vermischung der hydrophilen Bouillon mit dem lipophilen ÄÖ zu erreichen.<sup>24</sup> Die Bakteriensuspension wurde in steriler NaCl-Lösung (0,9 %, pH 5,7–5,8) hergestellt und mittels Densitometer (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland) auf 2,0 McFarland eingestellt.

Eine serielle Verdünnungsreihe der ÄÖ, sowie die Vorverdünnung und Zugabe der Keimsuspension, wurden mittels Pipettiermaschine (Precision, BioTek Instruments, USA) durchgeführt (Abbildung 2).

Es ergab sich ein Endvolumen von 100 µl pro Vertiefung mit folgenden ÄÖ-Konzentrationen in 1 %-iger Polysorbat-WCB: 10 %, 5 %, 2,5 %, 1,25 %, 0,625 %, 0,313 %, 0,156 %, 0,078 %, 0,039 %, und 0,02 %. Die ursprüngliche 2,0 McFarland Keimsuspension lag in einer Endverdünnung von 1:200 pro Vertiefung vor.

Eine Wachstumskontrolle mit WCB, dem Emulgator Polysorbat jedoch ohne ÄÖ sowie eine Wachstumskontrolle mit WCB, ohne Polysorbat und ohne ÄÖ wurden mitgeführt. Die zweite Wachstumskontrolle wurde eingeführt, um mögliche Einflüsse des Polysorbats auf das Keimwachstum auszuschliessen. Anschliessend wurden die Mikrotiterplatten bei 36 ± 1 °C über 16–20 h inkubiert.<sup>17</sup>

Als MHK wurde die tiefste ÄÖ-Konzentration notiert, die ein Keimwachstum inhibierte.

Die visuelle Beurteilung der MHK-Methode, i.e., die Knöpfchenbildung am Boden der Vertiefungen, ist beim Einsatz von ÄÖ nicht fehlerfrei möglich, da die Nährflüssigkeit durch die ÄÖ getrübt wird. Daher wird der Farbindikator Resazurin als Hilfsmittel zur visuellen Auswertung und als Objektivierung derselben verwendet (Resazurin Sodium Salt, Lot: MHCG3379, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Resazurin, auch Alamarblau genannt, ist ein blau-violetter Farbstoff, der durch Reduktion zu Resorufin (pink) und weiter zu Hydroresorufin (farblos) umgewandelt wird und so als Indikator für Zellwachstum dient.<sup>21</sup> Eine 0,01 % Lösung von Resazurin in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, BRAUN Aqua destilliert, pH 7,2) wurde hergestellt.<sup>4</sup>

In jede Vertiefung wurden 25 µl Resazurinlösung hinzugegeben. Nach erneuter Inkubation für 2–4 h bei 36 ± 1 °C konnte mithilfe des Farbumschlags daraufhin die MHK abgelesen werden.<sup>4</sup>



**Abbildung 1:** Agardiffusionstest mit konfluierendem Keimwachstum und deutlichem Hemmhof (Ajowanöl auf *P. multocida* Keimisolat Nr. 196).

## Erfassung der Wirkungsstärke

Aus den Duplikaten der Testansätze wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung angegeben. Hemmhofradien  $\geq 40$  mm wurden zur weiteren Berechnung mit 40 mm veranschlagt. Der Test auf Normalverteilung für die einzelnen Keim-ÄÖ-Kombinationen wurde mittels Shapiro-Wilk-Test in «R» (R Core Team, Wien, Österreich; <https://www.R-project.org/>) durchgeführt.

Mit den Mittelwerten der Duplikate wurde für jedes der acht verwendeten ÄÖ ein Medianwert errechnet.

## Resultate

### Ergebnisse der Agardiffusion

Bei der Agardiffusion zeigte sich ein konfluentes Keimwachstum mit einem deutlichen Hemmhof um das mit ÄÖ beladene Filterpapierplättchen (Abbildung 1). Grundsätzlich zeigten alle acht getesteten ÄÖ eine antibakterielle Wirkung gegenüber der 20 verwendeten *P. multocida*- und der 20 *M. haemolytica*-Isolate.

Mit Eukalyptusöl wurde bei sechs *P. multocida*-Isolaten (Nr. 32, 49, 58, 92, 130 und 141) ein atypisches Keimwachstum beobachtet. Dort waren die Kolonien nicht konfluent gewachsen, sondern multifokal auf der Agarplatte verteilt (Abbildung 2). Dies verunmöglichte das Messen



**Abbildung 2:** Atypisches Keimwachstum von *P. multocida* mit Eukalyptusöl. Die Kolonien sind multifokal auf der Agarplatte verteilt.

Antimikrobielle in-vitro-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachentupferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmann, D. Bismarck, O. J. Glardon, M. Meylan, J. Becker

**Tabelle 2:** Mittelwerte der Hemmhofradien (mm) aus den Duplikaten mittels Agardiffusion getesteten ätherischen Ölen auf 20 *P. multocida*-Isolate mit Standardabweichung ( $\pm$ ). aW=kein interpretierbares Aromatogramm erhältlich.

Keim-Nr.	<i>Pasteurella multocida</i>															
	Ajowanöl		Fenchelöl		Thymianöl		Teebaumöl		Oreganoöl		Bergbohnenkrautöl		Lemongrasöl		Eukalyptusöl	
1	20	$\pm 0,00$	4,75	$\pm 0,25$	21	$\pm 0,50$	5,75	$\pm 0,25$	20,25	$\pm 1,25$	18	$\pm 0,50$	31,75	$\pm 0,75$	4,75	$\pm 0,25$
24	20,25	$\pm 0,25$	7	$\pm 0,50$	21,5	$\pm 0,00$	6,75	$\pm 0,75$	16,5	$\pm 0,50$	18,5	$\pm 0,50$	35,5	$\pm 0,50$	5,25	$\pm 0,25$
27	22,25	$\pm 0,25$	7,5	$\pm 0,50$	23	$\pm 0,50$	8,75	$\pm 1,25$	22,5	$\pm 0,00$	20,75	$\pm 0,75$	40	$\pm 0,00$	5,25	$\pm 0,25$
31	20,5	$\pm 1,00$	5,75	$\pm 0,25$	20,25	$\pm 0,25$	10,5	$\pm 0,50$	20	$\pm 0,00$	20	$\pm 0,50$	40	$\pm 0,00$	5	$\pm 0,50$
32	20	$\pm 1,00$	8,25	$\pm 0,75$	21	$\pm 0,00$	15,75	$\pm 0,75$	23	$\pm 0,50$	22,25	$\pm 1,25$	40	$\pm 0,00$	aW	
33	19,25	$\pm 0,75$	7	$\pm 0,00$	18,25	$\pm 0,25$	11	$\pm 0,00$	18,75	$\pm 0,75$	16,75	$\pm 1,25$	34,5	$\pm 1,50$	5,25	$\pm 0,25$
49	21,75	$\pm 0,75$	11	$\pm 0,50$	23	$\pm 1,00$	14,75	$\pm 0,75$	23	$\pm 0,00$	21	$\pm 0,50$	40	$\pm 0,00$	aW	
53	18,75	$\pm 0,25$	6	$\pm 0,00$	20,5	$\pm 0,50$	8	$\pm 0,50$	20,75	$\pm 1,25$	17,25	$\pm 0,75$	40	$\pm 0,00$	4,75	$\pm 0,25$
58	20,5	$\pm 0,50$	7,75	$\pm 0,25$	21,25	$\pm 0,75$	16,25	$\pm 0,25$	20,5	$\pm 0,50$	22	$\pm 2,00$	40	$\pm 0,00$	aW	
60	20,25	$\pm 0,25$	6	$\pm 0,00$	21,5	$\pm 0,00$	6,25	$\pm 0,25$	20,5	$\pm 0,00$	19,25	$\pm 0,75$	40	$\pm 0,00$	4,5	$\pm 0,00$
66	20	$\pm 0,00$	5,5	$\pm 0,00$	22,25	$\pm 0,25$	6,5	$\pm 1,00$	21,5	$\pm 0,00$	20	$\pm 0,50$	38,75	$\pm 1,25$	5	$\pm 0,00$
74	18,5	$\pm 0,50$	6	$\pm 0,00$	21,25	$\pm 0,75$	6,75	$\pm 0,25$	19,25	$\pm 0,25$	18,5	$\pm 0,50$	35,75	$\pm 0,75$	4,5	$\pm 0,00$
92	20	$\pm 1,00$	6,5	$\pm 0,00$	21,5	$\pm 1,50$	14,25	$\pm 0,25$	21,5	$\pm 1,00$	20	$\pm 1,50$	40	$\pm 0,00$	aW	
102	19,25	$\pm 0,25$	5,25	$\pm 0,25$	21,25	$\pm 0,25$	6	$\pm 0,00$	18,5	$\pm 1,00$	18,75	$\pm 0,25$	37,25	$\pm 0,75$	4,5	$\pm 0,00$
116	18,75	$\pm 0,25$	5,25	$\pm 0,25$	20,75	$\pm 0,25$	6,5	$\pm 0,50$	19	$\pm 1,00$	18,5	$\pm 1,00$	37	$\pm 0,00$	4,5	$\pm 0,00$
123	19,25	$\pm 0,25$	5,5	$\pm 0,00$	21,75	$\pm 0,25$	6,5	$\pm 0,00$	20,75	$\pm 0,25$	19,75	$\pm 0,75$	37,5	$\pm 2,50$	6,5	$\pm 1,00$
130	23,5	$\pm 0,50$	18,25	$\pm 1,75$	25,5	$\pm 0,00$	24,5	$\pm 1,50$	25,5	$\pm 0,50$	24,75	$\pm 1,25$	40	$\pm 0,00$	aW	
141	19,5	$\pm 1,50$	9,25	$\pm 0,25$	25	$\pm 0,00$	23,5	$\pm 1,00$	26,5	$\pm 2,00$	27,25	$\pm 1,25$	40	$\pm 0,00$	aW	
160	20	$\pm 0,00$	7	$\pm 0,00$	21	$\pm 1,00$	9,5	$\pm 0,50$	20,25	$\pm 0,25$	20	$\pm 0,00$	40	$\pm 0,00$	5,75	$\pm 0,25$
196	19,75	$\pm 0,25$	9,75	$\pm 0,25$	23,5	$\pm 0,00$	10	$\pm 1,00$	21,75	$\pm 0,75$	20,25	$\pm 0,75$	40	$\pm 0,00$	6	$\pm 0,00$
alle	20	$\pm 1,34$	6,625	$\pm 2,99$	21,5	$\pm 1,69$	9,375	$\pm 5,53$	20,625	$\pm 2,40$	19,625	$\pm 2,59$	40	$\pm 2,47$	4,875	$\pm 0,69$

Antimikrobielle in-vitro-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachentupferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmann, D. Bismarck, O. J. Glardon, M. Meylan, J. Becker

eines Hemmhofradius. Bei der Wiederholung zeigten sich jedoch unveränderte Resultate, sodass diese Beispiele als nicht interpretierbar beurteilt und aus der Studie ausgeschlossen wurden. Deshalb gilt für Eukalyptusöl in der Agardiffusion für *P. multocida* n=14.

**Wirkung der ätherischen Öle auf das Wachstum von *Pasteurella multocida* in der Agardiffusion**

Ausschliesslich bei der Testung von Lemongrasöl auf *P. multocida* wurden Hemmhofradien von <sup>3</sup>40 mm beob-

achtet. Lemongrasöl zeigte mit einem Median von <sup>3</sup>40 mm die grösste Wirksamkeit (Abbildung 3). Ajowan-, Thymian-, Oregano- und Bergbohnenkrautöl zeigten alle eine vergleichbare Wirkung auf die *P. multocida*-Isolate mit Medianwerten der Hemmhöfe um 20 mm.

Der Medianwert von Teebaumöl betrug 9,13 mm. In den Resultaten von Teebaumöl gab es starke Schwankungen: die Grösse der Hemmhofradien reichte von 5,75 mm bis 24,5 mm (Tabelle 2). Fenchel- und Eukalyptusöl zeigten durchgehend kleine Hemmhofradien mit einem Median von 6,75 mm resp. 5,00 mm.

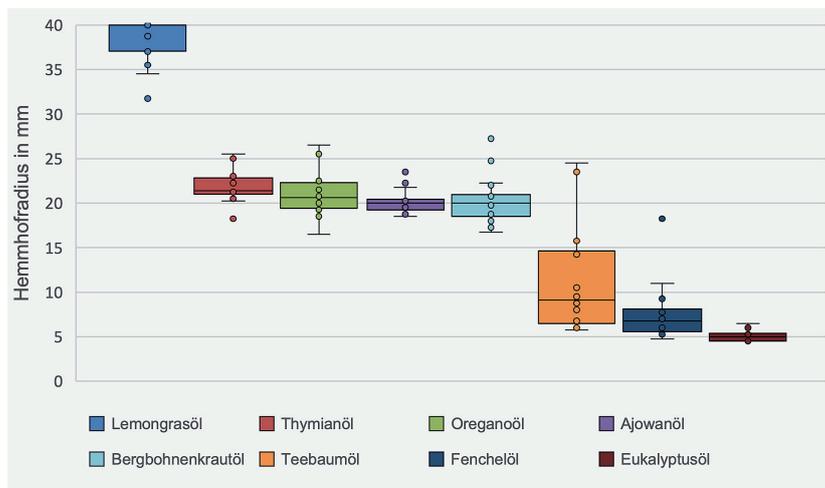


Abbildung 3: Hemmhofdurchmesser von *Pasteurella multocida* aus tiefen Nasenrachentupferproben von Schweizer Mastkälbern auf acht ätherische Öle im Agardiffusionstest.

**Wirkung der Ätherische Öle auf *Mannheimia haemolytica* in der Agardiffusion**

Ajowan-, Thymian-, Oregano-, Bergbohnenkraut- und Lemongrasöl zeigten einen medianen Hemmhof zwischen 14,25 mm (Lemongrasöl) und 16,5 mm (Thymianöl) bei *M. haemolytica* (Abbildung 4). Der Medianwert von Teebaumöl lag bei 7,5 mm, derjenige von Fenchelöl bei 7,0 mm. Eukalyptusöl zeigte den kleinsten Medianwert mit 4,5 mm.

**Ergebnisse in der Mikrodilution**

Mittels Mikrodilution wurden 16 der *P. multocida*- und 18 der *M. haemolytica*-Isolate untersucht. Zwischen den Wachstumskontrollen mit und ohne Emulgator wurde kein Unterschied festgestellt. Alle acht ÄÖ zeigten eine antibak-

Tabelle 3: Mittelwerte der Hemmhofradien (mm) aus den Duplikaten mittels Agardiffusion getesteten ätherischen Ölen auf 20 *M. haemolytica*-Isolate mit Standardabweichung (±).

Mannheimia haemolytica											
Keim-Nr.	Ajowanöl	Fenchelöl	Thymianöl	Teebaumöl	Oreganoöl	Bergbohnenkrautöl	Lemongrasöl	Eukalyptusöl			
29	14,25 ±0,75	7,25 ±0,25	14,5 ±0,50	7,25 ±0,25	14,5 ±0,50	14	14,25 ±1,25	4 ±0,00			
48	18,5 ±0,50	6,5 ±0,00	19,75 ±0,25	7,5 ±0,50	19,25 ±0,25	18,5 ±0,00	16 ±0,00	5,25 ±0,25			
52	15,75 ±0,25	8 ±0,00	17,75 ±0,75	7,5 ±0,00	16 ±0,00	14,75 ±0,25	14 ±0,50	4,25 ±0,25			
78	16 ±0,00	7 ±0,00	17,25 ±0,25	7,5 ±0,00	16,75 ±0,25	15,75 ±0,25	13,75 ±0,25	4,5 ±0,00			
82	14 ±0,00	6,25 ±0,25	15 ±0,50	7 ±0,00	13,75 ±0,25	13,75 ±0,75	13 ±0,00	4,25 ±0,25			
93	15,5 ±0,00	7,25 ±0,25	16,5 ±0,00	7,75 ±0,25	15,75 ±0,25	14,75 ±0,25	14,25 ±0,25	4,75 ±0,25			
94	15,5 ±0,00	7 ±0,00	16 ±0,00	7,75 ±0,25	16,75 ±0,25	16,25 ±0,25	14,75 ±0,25	4,75 ±0,25			
97	15,25 ±0,25	6,5 ±0,00	16,5 ±0,50	7,25 ±0,25	16,25 ±0,75	15 ±0,50	15 ±0,50	4,75 ±0,25			
100	15,75 ±0,25	7,5 ±0,00	17,25 ±0,25	8 ±0,00	17 ±0,00	15,75 ±0,25	15 ±0,00	5 ±0,00			
103	15,25 ±0,25	7,25 ±0,25	16,5 ±0,00	8 ±0,00	15,5 ±0,00	15,25 ±0,25	13,25 ±0,25	4,5 ±0,00			
113	14,75 ±0,25	6,25 ±0,25	16 ±0,00	6,75 ±0,25	16 ±0,00	15,25 ±0,25	14 ±0,50	4,25 ±0,25			
128	15,25 ±0,25	7,75 ±0,25	14,75 ±0,75	8,25 ±0,25	16,5 ±0,00	16 ±0,00	15,25 ±0,25	6 ±0,00			
133	15,25 ±0,25	7,25 ±0,25	16,5 ±0,00	7,75 ±0,25	15,5 ±0,50	15,25 ±0,25	14,25 ±0,25	5 ±0,00			
134	14,75 ±0,25	6,5 ±0,00	15,5 ±0,00	6,75 ±0,25	15 ±0,00	13,75 ±0,25	15,75 ±0,25	4,5 ±0,00			
150	13,25 ±0,25	7 ±0,00	14,25 ±0,25	6,5 ±0,00	13,75 ±0,25	13,25 ±0,25	14,25 ±0,75	4,25 ±0,25			
158	16 ±0,00	7 ±0,00	17,25 ±0,25	7,75 ±0,25	15,75 ±0,25	15,5 ±0,50	14,75 ±0,25	4,25 ±0,25			
171	15 ±0,50	7 ±0,00	16,25 ±0,25	7,75 ±0,25	15,5 ±0,50	14,75 ±0,25	15 ±0,00	5 ±0,00			
172	16 ±0,00	6 ±0,00	17,5 ±0,00	6,5 ±0,00	16,25 ±0,25	15 ±0,00	13 ±0,00	4,5 ±0,00			
174	14,25 ±0,25	6,5 ±0,00	17 ±1,00	6,75 ±0,25	16 ±0,00	14,75 ±0,25	14,5 ±0,50	4,5 ±0,00			
189	15,25 ±0,25	7,5 ±0,00	15,5 ±0,50	7,25 ±0,25	15,25 ±0,25	14,5 ±0,00	13,75 ±0,25	4,5 ±0,00			
alle	15,5 ±1,07	7 ±0,54	16,5 ±1,33	7,5 ±0,56	16 ±1,21	15 ±1,14	14,5 ±0,91	4,5 ±0,47			

terielle Wirkung auf die inkludierten Isolate (Abbildung 5, 6). Im vorangegangenen Testansatz waren die nicht getesteten Stämme nicht angewachsen. Die Wachstumskontrollen waren ausserdem negativ. Die ätherischen Öle der vorhandenen Chargen reichten nicht für eine Testwiederholung aus. Eine Wiederholung mit einer anderen Charge wäre aufgrund einer möglichen anderen der Öle Zusammensetzung nicht sinnvoll.

**Effekte der ätherischen Öle auf das Wachstum von *Pasteurella multocida* in der Mikrodilution**

In der Mikrodilution zeigte sich Lemongrasöl gegenüber *P. multocida* als potentestes ÄÖ mit einer MHK von 0,078 %. Bergbohnenkraut- und Eukalyptusöl zeigten mediane MHK-Werte von 0,39 % bzw. 0,23 %. Bei einer Ölkonzentration von 0,625 % erreichten Oregano-, Teebaum- und Thymianöl eine vollständige Hemmung. Die höchsten MHK-Werte (1,25 %) zeigten Ajowan- und Fenchelöl (Abbildung 5).

**Effekte der ätherischen Öle auf *Mannheimia haemolytica* in der Mikrodilution**

Die tiefsten MHK-Werte gegenüber den getesteten *M. haemolytica*-Isolaten zeigte Lemongrasöl mit einem Medianwert von 0,156 %. Für Teebaumöl wurde ein Medianwert von 0,547 % beobachtet. Thymian-, Oregano- und Bergbohnenkrautöl wiesen alle eine MHK von 0,625 % auf. Eukalyptusöl lag nur wenig darüber mit 0,781 %. Die höchsten MHK-Werte zeigten Ajowanöl und Fenchelöl (1,25 % bzw. 1,563 %) (Abbildung 6).

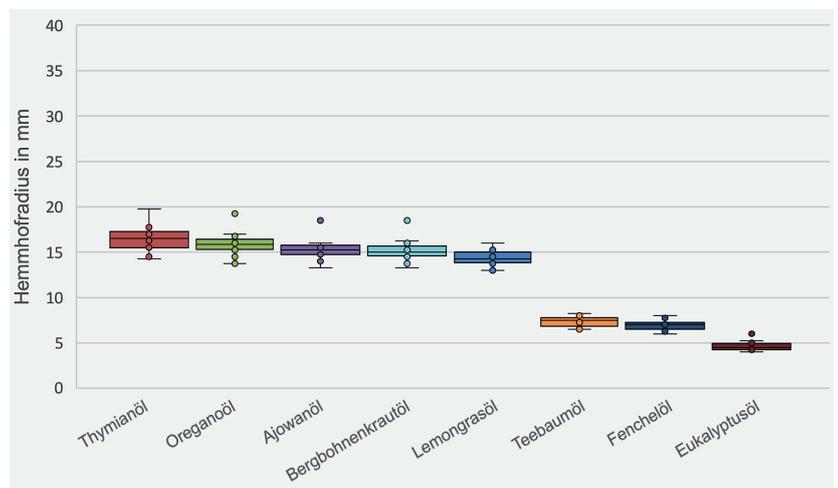
**Diskussion**

**Antibakterielle Wirkung der einzelnen ätherischen Öle**

In den durchgeführten Untersuchungen war Lemongrasöl von allen getesteten ÄÖ dasjenige mit der stärksten antibakteriellen Wirksamkeit. Ebenso zeigte Lemongras in der Studie von Mayaud et al. (2008) niedrige MHK-Werte gegenüber *P. multocida*.<sup>40</sup> Mittels Agardiffusion erhielt Chao (2008) gute Ergebnisse mit Lemongrasöl, welches das

Antimikrobielle in-vitro-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachentupferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmann, D. Bismarck, O. J. Glardon, M. Meylan, J. Becker



**Abbildung 4:** Hemmhofdurchmesser von *Mannheimia haemolytica* aus tiefen Nasenrachentupferproben von Schweizer Mastkälbern auf acht ätherische Öle im Agardiffusionstest.

**Tabelle 4:** Mittelwerte der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK in %) mit Standardabweichung (±) aus den Duplikaten mittels Mikrodilution getesteten ätherischen Ölen auf 16 *Pasteurella multocida*-Isolate.

<i>P. multocida</i>									
Keim-Nr.	Ajowanöl	Fenchelöl	Thymianöl	Teebaumöl	Oreganoöl	Bergbohnenkrautöl	Lemongrasöl	Eukalyptusöl	
1	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,469 ±0,16	0,234 ±0,08	0,078 ±0,00	0,156 ±0,00	
24	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,078 ±0,00	0,039 ±0,00	0,039 ±0,00	0,195 ±0,12	
27	0,313 ±0,00	0,313 ±0,00	0,156 ±0,00	0,156 ±0,00	0,234 ±0,08	0,078 ±0,00	0,039 ±0,00	0,156 ±0,00	
31	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,469 ±0,16	0,117 ±0,04	0,039 ±0,00	0,078 ±0,00	
32	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	1,250 ±0,00	0,469 ±0,16	0,078 ±0,00	0,234 ±0,08	
49	2,500 ±0,00	6,250 ±3,75	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	0,938 ±0,31	0,078 ±0,00	0,938 ±0,31	
53	2,500 ±0,00	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	0,469 ±0,16	0,117 ±0,04	0,938 ±0,31	
58	2,500 ±0,00	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,469 ±0,16	0,469 ±0,16	0,039 ±0,00	0,234 ±0,08	
60	0,625 ±0,00	2,500 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	0,469 ±0,16	0,078 ±0,00	0,156 ±0,00	
66	2,500 ±0,00	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	2,500 ±0,00	0,938 ±0,31	0,156 ±0,00	0,938 ±0,31	
74	1,875 ±0,63	2,500 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	1,875 ±0,63	0,469 ±0,16	0,156 ±0,00	0,469 ±0,16	
102	0,625 ±0,00	2,500 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,469 ±0,16	0,117 ±0,04	0,313 ±0,00	
116	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,078 ±0,00	0,234 ±0,08	
141	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,625 ±0,00	0,469 ±0,16	0,313 ±0,00	0,234 ±0,08	0,078 ±0,00	0,469 ±0,16	
160	1,250 ±0,00	2,500 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,938 ±0,31	0,234 ±0,08	0,078 ±0,00	0,469 ±0,16	
196	2,500 ±0,00	2,500 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,078 ±0,00	0,234 ±0,08	

Antimikrobielle in-vitro-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachentupferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmann, D. Bismarck, O. J. Glardon, M. Meylan, J. Becker

Wachstum eines Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stamm hemmte.<sup>18</sup> Ähnlich der Resultate aus der vorliegenden Studie mittels Agardiffusion auf *P. multocida* zeigte sich in der Studie von Chao (2008) vollständige Keimwachstumshemmung auf der ganzen Agarplatte.<sup>18</sup> Auch mittels Agardiffusion zeigte sich Lemongrasöl gegenüber tierpathogenen Keimen als gut wirksam.<sup>13</sup> Ajo-

wan-, Thymian-, Oregano- und Bergbohnenkrautöl zeigten im Agardiffusionstest gegenüber allen Isolaten von *P. multocida* und *M. haemolytica* vergleichbar grosse Hemmhofradien (Abbildung 3, 4). Diese vier ÄÖ haben einen hohen Anteil der Phenole Carvacrol und Thymol (Tabelle 1), für die bereits in anderen Studien eine antibakterielle Wirkung aufgezeigt wurde.<sup>33</sup>

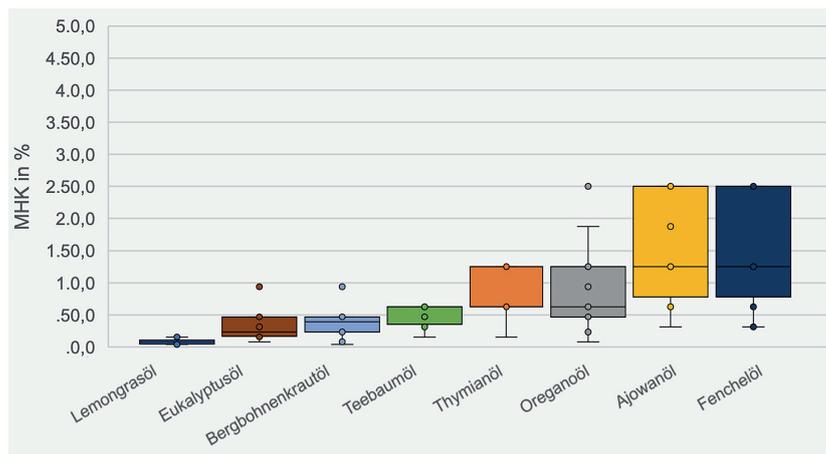


Abbildung 5: Minimale Hemmkonzentrationen acht ätherischer Öle in der Mikrodilution auf *Pasteurella multocida* aus tiefen Nasenrachentupferproben von Schweizer Mastkälbern.

Thymian- und Ajowanöl zeigten in der vorliegenden Studie sowohl gegen *P. multocida* als auch *M. haemolytica* MHK-Werte von 0,625 % bzw. 1,25 %. Hingegen beobachteten Amat et al. (2019) in einer in-vitro-Studie tiefere MHK-Werte für Ajowan- und Thymianöl gegen *P. multocida* (0,013 %) und *M. haemolytica* (0,025 %).<sup>2</sup> Allerdings enthielt das in der vorliegenden Studie verwendete Ajowanöl einen geringeren Gehalt an Thymol als das in der Studie von Amat et al. (2019)<sup>2</sup> (25,2 % vs. 46,6 %). Ähnliches gilt für den Thymol-Gehalt des Thymianöls (45 % vs. 58,5 %).

Fenchelöl zeigte kleine Hemmhofradien in der Agardiffusion und höhere MHK-Werte in der Mikrodilution auf die getesteten Keimisolate, und gehörte demnach zu den weniger wirksamen ÄÖ unserer Studie. In der Studie von Amat et al. (2019)<sup>2</sup> hingegen zeigte Fenchelöl eine ähnlich gute Wirkung wie Ajowan- und Thymianöl. Der Gehalt von

Tabelle 5: Mittelwerte der Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK in %) mit Standardabweichung (±) aus den Duplikaten mittels Mikrodilution getesteten ätherischen Ölen auf 18 *Mannheimia haemolytica* Isolate.

M. haemolytica								
Keim-Nr.	Ajowanöl	Fenchelöl	Thymianöl	Teebaumöl	Oreganoöl	Bergbohnenkrautöl	Lemongrasöl	Eukalyptusöl
29	2,500 ±0,00	5,000 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	3,750 ±1,25
48	1,875 ±0,63	5,000 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	3,750 ±1,25
52	1,250 ±0,00	3,750 ±1,25	0,469 ±0,16	0,313 ±0,00	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	2,500 ±0,00	5,000 ±0,00
78	1,250 ±0,00	2,500 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,156 ±0,00	0,938 ±0,31
82	1,250 ±0,00	5,000 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,469 ±0,16	0,156 ±0,00	0,625 ±0,00
93	1,875 ±0,63	1,875 ±0,63	0,938 ±0,31	0,469 ±0,16	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,938 ±0,31
94	1,250 ±0,00	2,500 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	0,938 ±0,31	0,156 ±0,00	0,938 ±0,31
97	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,625 ±0,00	0,469 ±0,16	0,078 ±0,00	0,469 ±0,16
100	2,500 ±0,00	1,250 ±0,00	1,875 ±0,63	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	0,938 ±0,31	0,234 ±0,08	0,938 ±0,31
103	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	1,250 ±0,00	0,938 ±0,31	0,313 ±0,00	0,625 ±0,00
113	2,500 ±0,00	5,000 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	0,469 ±0,16	0,156 ±0,00	0,469 ±0,16
128	2,500 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	1,250 ±0,00	0,938 ±0,31	0,313 ±0,00	1,250 ±0,00
133	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,313 ±0,00	0,313 ±0,00	0,117 ±0,04	0,078 ±0,00	0,117 ±0,04
150	1,250 ±0,00	3,750 ±1,25	0,938 ±0,31	0,625 ±0,00	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,313 ±0,00	0,938 ±0,31
158	1,250 ±0,00	1,250 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,625 ±0,00	0,156 ±0,00	0,313 ±0,00
172	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,313 ±0,00	0,234 ±0,08	0,234 ±0,08	0,156 ±0,00	0,078 ±0,00	0,469 ±0,16
174	0,625 ±0,00	0,234 ±0,08	0,156 ±0,00	0,234 ±0,08	0,156 ±0,00	0,078 ±0,00	0,039 ±0,00	0,156 ±0,00
189	0,625 ±0,00	0,938 ±0,31	0,313 ±0,00	0,313 ±0,00	0,625 ±0,00	0,313 ±0,00	0,078 ±0,00	0,469 ±0,16

trans-Anethol des in der Studie von Amat et al. (2019)<sup>2</sup> verwendeten Fenchelöls war höher als derjenige des in unserer Studie verwendeten Öls (78,1 % resp. 50,89 %).

Der unterschiedlich hohe Anteil bestimmter Komponenten eines entsprechenden ÄÖ sowie abweichende Isolations- und Testmethoden erschweren den Vergleich verschiedener Studien und sollten in diesem Zusammenhang stets berücksichtigt werden.

Die Resultate für die vier Öle mit hohem Thymol- und Carvacrolanteil (Thymian-, Oregano-, Ajowan- und Bergbohnenkrautöl) sind im Agardiffusionstest ähnlich, ihre MHK-Werte in der Mikrodilution fallen jedoch, ausgenommen von Thymian- und Oreganoöl, unterschiedlich aus (Abbildung 5, 6). Eine mögliche Erklärung dafür ist ein unterschiedliches Verhalten der ÄÖ in den verschiedenen Nährmedien sowie die unterschiedlichen verwendeten Ursprungsbakterienkonzentrationen. Auch die Resultate mit Eukalyptusöl sind in dieser Hinsicht interessant. Im Agardiffusionstest zeigte Eukalyptusöl im Vergleich zu den anderen ÄÖ kleinere Hemmhofradien. In der Mikrodilution hingegen wurde bereits bei einer Ölkonzentration von 0,234 % mit *P. multocida* und bei 0,81 % mit *M. haemolytica* eine Hemmung beobachtet. Auch hier könnte die Diffusionseigenschaft des Öls im Agar für diese Unterschiede verantwortlich sein. Übereinstimmende Ergebnisse erhielten Studien, die die Agardilutions-Methode anwandten. Dabei werden die zu testenden Keime auf Agarplatten, die unterschiedliche Ölkonzentrationen enthalten aufgetragen und inkubiert, dies ermöglicht ebenfalls die Bestimmung der MHK.<sup>7</sup> In der Studie von Mayaud et al. (2008)<sup>40</sup> wies Eukalyptusöl gegenüber *P. multocida* einen MHK-Wert von 1,25 % auf und in der Studie von Amat et al. (2019)<sup>2</sup> wurde für Eukalyptusöl in den getesteten Konzentrationen von <0,05 % keine antibakterielle Wirkung gegenüber *M. haemolytica* beobachtet.<sup>2,40</sup>

Desweiteren ist das atypische Bakterienwachstum im Agardiffusionstest bei sechs *P. multocida*-Isolaten im Test mit Eukalyptusöl aufgetreten, das sich auch nach Wiederholung gleichermassen zeigte. Wir vermuten, dass dieser Keim hierbei auf eine volatile Komponente des Eukalyptusöls reagierte.

Um die Wirkung volatiler Bestandteile von ÄÖ zu untersuchen, steht als *in-vitro*-Methode z.B. der Vapor Phase Test zur Verfügung.<sup>27</sup> Diese Methode zusätzlich anzuwenden ist sinnvoll, da eine antibakterielle Wirkung auf volatile Bestandteile aufgezeigt werden konnte, die mittels Agardiffusion hingegen nicht sichtbar waren.<sup>29</sup> In wissenschaftlichen Arbeiten, die die Wirkung ÄÖ auf Bakterien oder Pilze untersuchen, die von Relevanz in der Entstehung von Respirationserkrankungen sind, werden derartige Methoden teilweise angewandt.<sup>1,3,28</sup> Auch für die in der vorliegenden Studie getesteten Keimisolate und ÄÖ wäre eine weitere Untersuchungen mit dieser Methode interessant.

Um eine komplette Hemmung zu erreichen, war Teebaumöl in der Mikrodilution in einer Konzentration von 0,625 % bei *P. multocida* und von 0,547 % bei *M. haemolytica* nötig. Damit war Teebaumöl ähnlich wirksam wie Oregano- und Thymianöl. Dies stimmt mit Resultaten anderer Studien über Teebaumöl mit *P. multocida* überein, die einen MHK-Wert von 0,47 mittels Agardilution ermittelten.<sup>40</sup> Auffällig waren die variablen Werte in der Agardiffusion mit Teebaumöl gegenüber *P. multocida* (Hemmhofradien von 5,75 mm bis 24,5 mm). Dies lässt eine variable Empfindlichkeit der Keime vermuten.

### Empfindlichkeit der Keime

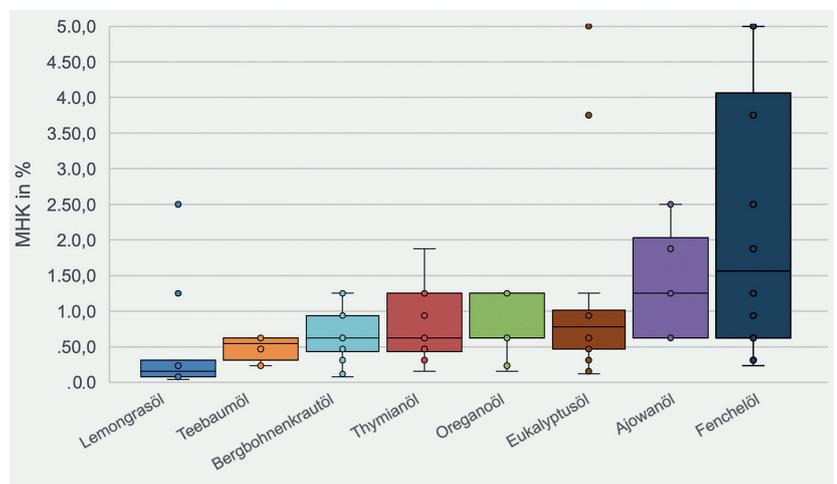
Für die *P. multocida*-Isolate wurden allgemein im Vergleich zu den *M. haemolytica*-Isolaten kleinere Hemmhofradien im Agardiffusionstest gemessen. Die Resultate von *M. haemolytica* waren konstanter als die von *P. multocida*. Zudem konnten innerhalb der Keime unterschiedliche Resultate für dasselbe ÄÖ beobachtet werden. Dies ist auch in Untersuchungen von *Pasteurellaceae* mit Antibiotika zu beobachten und weist darauf hin, dass Keime unterschiedliche Empfindlichkeiten auch im Zusammenhang mit anderen Wirkstoffen aufweisen.<sup>59</sup>

### Agardiffusion und Mikrodilution

Die oben gemachten Beobachtungen sind deskriptiv und sind nicht mit einer Empfindlichkeitstestung von Antibiotika zu vergleichen, für welche jeweils anerkannte Durchführungsvorschriften für *in-vitro*-Verfahren deren Interpretation anhand klinischer Grenzwerte gelten und erst damit eine vergleichbare Einteilung in «empfindlich», «intermediär» und «resistent» möglich wird.<sup>51</sup> Derartige Interpretationskriterien sind für ÄÖ momentan nicht vorhanden und es kann lediglich die Aussage getroffen werden, ob eine

Antimikrobielle *in-vitro*-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachentupferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmann,  
D. Bismarck, O. J. Glardon,  
M. Meylan, J. Becker



**Abbildung 6:** Minimale Hemmkonzentrationen acht ätherischer Öle in der Mikrodilution auf *Mannheimia haemolytica* aus tiefen Nasenrachentupferproben von Schweizer Mastkälbern.

Antimikrobielle  
in-vitro-Wirkung acht  
ätherischer Öle auf  
*Pasteurella multocida*  
und *Mannheimia*  
*haemolytica* aus  
Nasenrachentupferproben  
von Mastkälbern

B. A. Salzmann,  
D. Bismarck, O. J. Glardon,  
M. Meylan, J. Becker

antibakterielle Wirkung in den getesteten Konzentrationen vorliegt oder nicht.

Das Fehlen festgelegter Standards für die Durchführung von *in-vitro*-Tests mit ÄÖ erschwert den Vergleich zwischen Resultaten verschiedener Studien, zusätzlich zu der variablen Zusammensetzung der ÄÖ und ihrer Komponenten. In vielen Studien, in denen antimikrobielle Wirkstoffe getestet werden, werden deshalb die gewählten Methoden an die Standards für Mikrodilution und Agardiffusion, welche jeweils vom Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) oder der European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) veröffentlicht werden, angenähert.<sup>7,19,22</sup>

Bei der Agardiffusion sind nebst der antibakteriellen Wirkung der einzelnen Komponenten eines ÄÖ die Diffusionseigenschaften im Agar für die Grösse der Hemmhofradien bedeutend.<sup>27</sup> Ätherische Öle sind komplexe Stoffgemische, bei denen sich jede Komponente individuell im Agar verhält, was eine Aussage über die Diffusion im Agar eines ÄÖ in seiner Gesamtheit erschwert.<sup>25</sup> Beispielsweise diffundiert der Wirkstoff Farnesol schlecht durch den Agar und führt deshalb zu kleineren Hemmhofradien.<sup>27</sup> Dies kann zu einer Unterschätzung der Wirkung eines ÄÖ führen. Bei der Interpretation der Ergebnisse von Agardiffusionstests sollte dies berücksichtigt werden. Zu beachten ist, dass trotz einer möglichen Unterschätzung der antibakteriellen Wirksamkeit eines ÄÖ aufgrund schlechter Diffusionseigenschaften im Agar ein vorhandener Hemmhof eine antibakterielle Wirkung beweist. Somit hat die Agardiffusion als Screeningtest und realisierbare Routineuntersuchung weiterhin ihre Berechtigung.

Der Vorteil des aufwändigeren Dilutionsverfahrens ist ein direkter Kontakt aller Wirkkomponenten des ÄÖ mit den Erregern im Flüssigmedium. Trotzdem müssen auch bei der Mikrodilution die lipophilen Eigenschaften vieler Komponenten der ÄÖ beachtet werden und wenn zum Flüssigmedium kein effizienter Emulgator hinzugefügt wird, kann es auch hier zu verfälschten Resultaten kommen.<sup>44</sup> In Verfahren mit Flüssignährstoffen wird deshalb das Verwenden eines Emulgators dringlichst empfohlen.<sup>27</sup> Ein weiterer Vorteil der Dilution ist die Bestimmung des MHK-Werts, der trotz fehlender Interpretationskriterien (klinischer Grenzwerte) bezüglich der *In-vivo*-Wirksamkeit eine Orientierung bezüglich einer wirksamen Dosierung/Verdünnung des ÄÖ für eine topische Behandlung liefern kann, da er eine wirksame Konzentration angibt. Allerdings ist auch hier zu beachten, dass es sich um ein reines *in vitro*-Ergebnis handelt, das Gegebenheiten *in vivo*, wie z.B. Entzündungsprozesse, nicht vollständig widerspiegeln kann.

Weitere Faktoren die Resultate des Agardiffusionstests und der Mikrodilution beeinflussen: Art des Agars oder Nährmediums, Dauer der Inkubationszeit, verwendete Stamm-

kulturen, unterschiedliche Keimdichten und die volatilen Eigenschaften von den in den ÄÖ enthaltenen Komponenten. In der Agardiffusion können zudem die Agardichte oder ein zu hoher wie auch zu tiefer pH-Wert die Grösse der Hemmhofradien beeinflussen.<sup>29</sup>

In der Auswertung der Resultate der Mikrodilution kann die Trübung des Mediums durch die ÄÖ die Erkennung des Keimwachstums anhand von Knöpfchenbildung erschweren. Deshalb wurde Resazurin verwendet. Die Bewertung des MHK-Werts wurde dadurch vereinfacht, da die Grenze zwischen Keimwachstum und keinem Keimwachstum durch den Farbumschlag leichter zu erkennen war. Die Bewertung mittels Resazurin wurde als sensitiver beurteilt, was sich bereits in anderen Studien bestätigte.<sup>39</sup>

### Antibiotikaresistenzen und Einsatzmöglichkeiten ätherischer Öle

Respirationserkrankungen stellen in der Kälbermast den häufigsten Grund für Antibiotikaeinsatz dar.<sup>35–37,45,48</sup> Für *P. multocida* und *M. haemolytica* wurden bereits Resistenzen gegen in der Klinik eingesetzte Antibiotika beobachtet.<sup>11,23,49,50,61</sup> Dies und die hohe wirtschaftliche Relevanz respiratorischer Erkrankungen in der Kälbermast sind unter anderem Gründe für die Suche nach alternativen Behandlungsmethoden.<sup>5,11,16</sup>

In einigen Studien konnte die antibakterielle Wirkung verschiedener ÄÖ auf Keime von Kälberpneumonie bereits nachgewiesen werden.<sup>2,3,28,40</sup> Dass ÄÖ auch auf antibiotikaresistente Keime wirken, wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt.<sup>13,18,57</sup> Eine Kombination von ÄÖ mit Antibiotika ist möglich.<sup>32,55</sup> Mittels einer Kombination von Thymol und Carvacrol mit Antibiotika konnte *in vitro* ein additiver Effekt gegen aus dem Respirationstrakt von Kälbern isolierte *P. multocida* und *M. haemolytica* nachgewiesen werden.<sup>32</sup> Entsprechende Kombinationen sollten stets im Vorfeld getestet werden, da ÄÖ auch antagonistisch zu Antibiotika wirken können.<sup>25,34</sup> *In vivo*-Studien dazu sind uns nicht bekannt.

### Schlussfolgerungen

Für einen wissenschaftlich fundierten Einsatz von ÄÖ gegen Respirationserkrankungen bei Kälbern kann momentan nur auf eine geringe Anzahl wissenschaftlicher Publikationen zurückgegriffen werden. Vor einer Therapie mit ÄÖ sollte der entsprechende Keim mittels *in vitro*-Verfahren auf dessen Empfindlichkeit getestet werden, da sich ÄÖ in ihrer Zusammensetzung und somit ihrer Wirksamkeit unterscheiden können, aber es auch unterschiedliche Empfindlichkeiten verschiedener Isolate der gleichen Bakterienart geben kann. In der vorliegenden Studie konnte für beide angewendeten *in vitro*-Methoden, der Agardiffusion und der Mikrodilution, für acht ÄÖ eine antibakterielle

Wirkung gegen *P. multocida* und *M. haemolytica* nachgewiesen werden. Eine standardisierte Interpretation dieser *in-vitro*-Ergebnisse bezüglich der *in-vivo*-Wirksamkeit, analog zur Einteilung von Antibiotika in Resistenzklassen, ist momentan aufgrund fehlender Kriterien nicht möglich. Wie auch in der aktuellen Studie beobachtet werden konnte, erzielt man mit unterschiedlichen Test-Verfahren verschiedene Resultate. Die verschiedenen biochemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten der ÄÖ könnten unter anderem dafür verantwortlich sein.

Um Handlungsalternativen zur Therapie mit antibiotikahaltigen Tierarzneimitteln für Tierhaltende sowie Tierärztinnen und Tierärzte zu schaffen, bedarf es einerseits weiterer, insbesondere auch klinischer Studien mit ÄÖ, und andererseits einer Standardisierung der Analyseverfahren.

## Danksagung

Wir danken Frau Elisabeth Müller, LABOKLIN GmbH & Co KG, D-97688 Bad Kissingen, für Ihre Unterstützung und die Möglichkeit, alle Untersuchungen in ihrem Labor durchzuführen. Ebenso danken wir Prof. Dr. Vincent Perreten und seinen Mitarbeitenden (Abteilung für Molekulare Epidemiologie und Infektiologie, Institut für Veterinär-bakteriologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern), die die Stämme im Rahmen des «Freiluftkalb»-Projektes isolierten.

Das «Freiluftkalb»-Projekt wurde durch das Nationale Forschungsprogramm 72 «Antimikrobielle Resistenz» des Schweizerischen Nationalfonds (Projekt 407240\_167083), durch IP-SUISSE und durch den Migros Genossenschaftsbund finanziert.

Antimikrobielle *in-vitro*-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachenpfeiferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmann,  
D. Bismarck, O. J. Glardon,  
M. Meylan, J. Becker

## Effet antimicrobien in vitro de huit huiles essentielles sur *Pasteurella multocida* et *Mannheimia haemolytica* isolés à partir d'échantillons d'écouvillons nasaux de veaux d'engraissement

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires de plantes aromatiques et sont utilisées en phytothérapie pour le traitement de différentes maladies. Dans la présente étude, huit huiles essentielles sélectionnées – huile d'ajowan (*Trachyspermum ammi* L.), huile de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill. *subsp. vulgare* var. *vulgare*), huile de thym chénotype (ct.) thymol (*Thymus vulgaris* L.), huile d'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), huile d'origan (*Origanum vulgare* L.), huile de sarriette de montagne (*Satureja montana* L.), huile de citronnelle (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) et huile d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) – ont été étudiées par diffusion sur gélose et microdilution pour leur effet antibactérien sur des isolats de *Pasteurella (P.) multocida* et de *Mannheimia (M.) haemolytica* provenant d'échantillons d'écouvillons nasaux profonds de veaux d'engraissement.

Les huit huiles essentielles se sont révélées efficaces sur les isolats testés. L'huile de citronnelle s'est avérée être la plus puissante des huit huiles essentielles, tandis que l'huile de fenouil n'était que faiblement efficace. Des effets différents ont été observés entre les deux méthodes de recherche utilisées. Par exemple, l'efficacité des huiles d'ajowan, de thym, d'origan et de sarriette de montagne était comparable dans la diffusion sur gélose. Cependant, cela n'a pas pu être reproduit avec la méthode de microdilution. *P. multocida* s'est révélée plus sensible que *M. haemolytica* à toutes les huiles essentielles testées.

## Effetto antimicrobico in vitro di otto oli essenziali su *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica* provenienti da tamponi nasofaringei profondi nei vitelli da ingrasso

Gli oli essenziali sono metaboliti secondari delle piante aromatiche e vengono utilizzati nella fitoterapia per il trattamento di varie malattie. Nel presente studio, sono stati selezionati otto oli essenziali – olio di ajowan (*Trachyspermum ammi* L.), olio di finocchio (*Foeniculum vulgare* Mill. *subsp. vulgare* var. *vulgare*), olio di timo chemotipo (ct.) timolo (*Thymus vulgaris* L.), olio di melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), olio di origano (*Origanum vulgare* L.), olio di santoreggia (*Satureja montana* L.), olio di citronella (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) e olio di eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) – e sono stati esaminati mediante diffusione in agar e microdiluzione per la loro attività antibatterica contro isolati di *Pasteurella (P.) multocida* e *Mannheimia (M.) haemolytica* provenienti da tamponi nasofaringei profondi di vitelli da ingrasso.

Tutti gli otto oli essenziali si sono dimostrati efficaci contro gli isolati testati. L'olio di citronella è risultato il più potente tra tutti gli oli essenziali, mentre l'olio di finocchio si è dimostrato solo debolmente efficace. Sono state anche osservate differenze di efficacia tra i due metodi di indagine utilizzati. Ad esempio, abbiamo riscontrato un'efficacia comparabile degli oli di ajowan, timo, origano e santoreggia nella diffusione in agar. Tuttavia, questa non si è riprodotta con il metodo della microdiluzione. *P. multocida* si è dimostrato più sensibile agli oli essenziali testati rispetto a *M. haemolytica*.

Questo studio dimostra in primo luogo che gli oli essenziali testati hanno un'attività antimicrobica *in vitro* sugli iso-

Antimikrobielle in-vitro-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachentupferproben von Mastkälbern

B. A. Salzmann, D. Bismarck, O. J. Gardon, M. Meylan, J. Becker

Cette étude montre premièrement que les huiles essentielles testées ont une efficacité antimicrobienne in vitro sur des isolats cliniques de *P. multocida* et de *M. haemolytica*. Deuxièmement, elle montre que la méthode d'examen est associée au résultat du test.

**Mots clés:** Diffusion sur gélose, aromagramme, huiles essentielles, *Mannheimia haemolytica*, microdilution, *Pasteurella multocida*

lati clinici di *P. multocida* e *M. haemolytica*. In secondo luogo, dimostra che il metodo di indagine è associato al risultato del test.

**Parole chiave:** Diffusione in agar, aromagramma, oli essenziali, *Mannheimia haemolytica*, microdiluzione, *Pasteurella multocida*

## Literaturnachweis

- Ali, S. & Yousef, A. Antifungal Activity of Volatiles from Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and Peppermint (*Mentha piperita*) Oils Against Some Respiratory Pathogenic Species of *Aspergillus*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2013; 2: 261–272.
- Amat, S. *et al.* Essential oils inhibit the bovine respiratory pathogens *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Histophilus somni* and have limited effects on commensal bacteria and turbinates cells in vitro. *J Appl Microbiol* 2019; 126: 1668–1682.
- Amat, S., Baines, D., Alexander, T. W., Correspondence, T. W. & Alexander, A.-. A vapour phase assay for evaluating the antimicrobial activities of essential oils against bovine respiratory bacterial pathogens. *Lett Appl Microbiol* 2017; 65: 189–495.
- Augsten, L., Heusinger, A., Müller, E. & Bismarck, D. Establishing microdilution for determination of minimum inhibitory concentrations of essential oils in routine diagnostics. Jahrestagung der FG „Innere Medizin und klinische Labordiagnostik“ der DVG (InnLab), Teil 2: Poster. 28. Jahrestagung der FG „Innere Medizin und klinische Labordiagnostik“ der DVG (InnLab) 2020; 28:.
- Ayrle, H. *et al.* Medicinal plants-prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. *BMC Vet Res* 2016; 12: 89.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 446–475.
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Koraihi Ibsouda, S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2015; 6: 71–79.
- Becker, J. *et al.* Antimicrobial susceptibility in *E. coli* and *Pasteurellaceae* at the beginning and at the end of the fattening process in veal calves: Comparing 'outdoor veal calf' and conventional operations. *Vet Microbiol* 2022; 269: 109419.
- Becker, J., Steiner, A., Meylan, M., Hauser, B. & Straub, U. Vergleichende Wirtschaftlichkeitsanalyse des Kälbermastsystems «Freiluftkalb» und der konventionellen IP-SUISSE-Labelmast. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2021; 163: 203–217.
- Becker, J. *et al.* Associations of antimicrobial use with antimicrobial susceptibility at the calf level in bacteria isolated from the respiratory and digestive tracts of veal calves before slaughter. *J Antimicrob Chemother* 2022; 77: 2859–2866.
- Beer, G., Doherr, M. G., Bähler, C., Meylan, M. & Einleitung, R. Antibiotikaeinsatz in der Schweizer Kälbermast. Band 2015; 157: 55–57.
- Bismarck, D., Kraus, L., Martinez, Y. & Müller, E. The aromagram – the method matters. 65th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research 2017; Book of Abstracts. Basel, Switzerland,.
- Bismarck, D., Schneider, M. & Müller, E. Antibakterielle In-vitro-Wirksamkeit ätherischer Öle gegen veterinärmedizinisch relevante Keime klinischer Isolate von Hunden, Katzen und Pferden. *Complement Med Res* 2017; 24: 153–163.
- Bouy, M. Ätherische Öle für Wiederkäuer – Bewährte Indikationen und Fallbeispiele aus der französischen Nutztierpraxis. in *Schweizerische Jahrestagung Für Phytotherapie 2018 – Ätherische Öle Und Ihr Therapeutisches Potential*. (Schweizerische Medizinische Gesellschaft für Phytotherapie, 2018).
- Brendieck-Worm, C. Atemwegserkrankungen beim landwirtschaftlichen Nutztier. *Zeitschrift für Phytotherapie* 2016; 37: 162–165.
- Brendieck-Worm, C., Stöger, E. & Klarer, F. *Heilende Kräuter Für Tiere – Pflanzliche Hausmittel Für Heim-Und Nutztiere*. (Haupt Verlag, Bern, 2015).
- Cermelli, C., Fabio, A., Fabio, G. & Quaglio, P. Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Curr Microbiol* 2008; 56: 89–92.
- Chao, S., Young, G., Oberg, C. & Nakaoka, K. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour Fragr J* 2008; 23: 444–449.
- Clinical & Institute, L. S. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. VET01S-Ed5. *CLSI supplement VET08* www.clsi.org (2022) vol. 5th 8.
- Dorfinger, G. Mikrobiologische Diagnostik (Aromagramm) in der Aromatherapie, Methoden und Anwendungsmöglichkeiten in der Urologie. in *Schweizerische Jahrestagung für Phytotherapie 2018 – Ätherische Öle Und Ihr Therapeutisches Potential* (Schweizerische Medizinische Gesellschaft für Phytotherapie, 2018).
- Elsikh, M. *et al.* Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett* 2016; 38: 1015–1019.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) – AST for bacteria. [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria) (2024).
- Federal Office of Public Health and Federal Food Safety and Veterinary Office. Swiss antibiotic resistance report 2020. Usage of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Switzerland. November 2020. 2020; 1–212.

- 24 Fernandes, C. P. *et al.* HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2013; 23: 108–114.
- 25 Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygadlo J & Demo M. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Molecular Medicinal Chemistry IDECEFYN* 2006; 10: 30–32.
- 26 Hendry, E. R., Worthington, T., Conway, B. R. & Lambert, P. A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1219–1225.
- 27 Husnu Can Baser, K. & Buchbauer, G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.* (Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, FL 3, 2016).
- 28 Inouye, S., Takizawa, T. & Yamaguchi, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 565–573.
- 29 Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C. & Baerheim Svendsen, A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med* 1987; 53: 395–398.
- 30 Kavanaugh, N. L. & Ribbeck, K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 4057.
- 31 Kim, Y.-G. *et al.* Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep* 2016; 6:.
- 32 Kissels, W., Wu, X. & Santos, R. Short communication: Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: In vitro effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract of calves. *J Dairy Sci* 2017; 100: 970–974.
- 33 Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. & Nychas, G.-J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91: 453–462.
- 34 Lang, G. & Buchbauer, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr J* 2011; 27: 13–39.
- 35 Lava, M. *et al.* Effect of calf purchase and other herd-level risk factors on mortality, unwanted early slaughter, and use of antimicrobial group treatments in Swiss veal calf operations. *Prev Vet Med* 2016; 126: 81–88.
- 36 Lava, M., Schüpbach-Regula, G., Steiner, A. & Meylan, M. Antimicrobial drug use and risk factors associated with treatment incidence and mortality in Swiss veal calves reared under improved welfare conditions. *Prev Vet Med* 2016; 126: 121–130.
- 37 Luginbühl, A. *et al.* Ergebnisse der integrierten tierärztlichen Bestandesbetreuung in der Kälbermast. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2012; 154: 277–285.
- 38 Magossi, G. *et al.* A single intranasal dose of essential oil spray confers modulation of the nasopharyngeal microbiota and short-term inhibition of *Mannheimia* in feedlot cattle: a pilot study. *Sci Rep* 2024; 14:.
- 39 Mann, C. M. & Markham, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol* 1998; 84: 538–544.
- 40 Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A. & Aubert, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett Appl Microbiol* 2008; 47: 167–173.
- 41 Mickiene, R., Bakutis, B. & Baliukoniene, V. Antimicrobial activity of two essential oils. *Ann Agric Environ Med* 2011; 18: 139–144.
- 42 Nostro, A. *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol* 2007; 56: 519–523.
- 43 Nostro, A. *et al.* Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 230: 191–195.
- 44 Pauli, A. & Kubeczka, K. Evaluation of inhibitory data of essential oil constituents obtained with different microbiological testing methods. in *27th International Symposium on Essential Oils* (ed. Essential Oils: Basic and Applied Research) (Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA, 1996). 33–36.
- 45 Pipoz, F. & Meylan, M. Calf health and antimicrobial use in Swiss dairy herds: Management, prevalence and treatment of calf diseases. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2016; 158: 389–396.
- 46 Pipoz, F., Perreten, V. & Meylan, M. Bacterial resistance in bacteria isolated from the nasal cavity of Swiss dairy calves. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2016; 158: 397–403.
- 47 Reichling, J., Frater-Schröder, M., Saller, R. & Fitz-Rathgen, J. *Heilpflanzenkunde Für Die Veterinärpraxis.* (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2016). vol. 3.
- 48 Schnyder, P., Schönecker, L., Schüpbach-Regula, G. & Meylan, M. Effects of management practices, animal transport and barn climate on animal health and antimicrobial use in Swiss veal calf operations. *Prev Vet Med* 2019; 167: 146–157.
- 49 Schönecker, L., Schnyder, P., Overesch, G., Schüpbach-Regula, G. & Meylan, M. Associations between antimicrobial treatment modalities and antimicrobial susceptibility in Pasteurellaceae and *E. coli* isolated from veal calves under field conditions. *Vet Microbiol* 2019; 236: 108363.
- 50 Schönecker, L., Schnyder, P., Schüpbach-Regula, G., Meylan, M. & Overesch, G. Prevalence and antimicrobial resistance of opportunistic pathogens associated with bovine respiratory disease isolated from nasopharyngeal swabs of veal calves in Switzerland. *Prev Vet Med* 2020; 185: 105182.
- 51 Schwarz, S. *et al.* Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol* 2010; 141: 1–4.
- 52 Selbitz, H., Truyen, U. & Valentin-Weigand, P. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- Und Seuchenlehre.* (Enke Verlag in MVS Medizinverlage, Stuttgart, 2015).
- 53 Shah, G. *et al.* Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *J Adv Pharm Technol Res* 2011; 2: 3.
- 54 Shahat, A. A. *et al.* molecules Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. *Molecules* 2011; 16: 16.
- Antimikrobielle in-vitro-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachenputferproben von Mastkälbern
- B. A. Salzmänn, D. Bismarck, O. J. Glardon, M. Meylan, J. Becker

- Antimikrobielle in-vitro-Wirkung acht ätherischer Öle auf *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Nasenrachenupferproben von Mastkälbern
- B. A. Salzmann,  
D. Bismarck, O. J. Glardon,  
M. Meylan, J. Becker
- <sup>55</sup> Si, H., Hu, J., Liu, Z. & Zeng, Z.-L. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Federation of European Microbiological Societies* 2008; 53: 190–194.
- <sup>56</sup> De Silva, B. C. J. *et al.* Antimicrobial property of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against pathogenic bacteria isolated from pet turtles. *Lab Anim Res* 2017; 33: 84.
- <sup>57</sup> Soo Xi Yap, P., Chin Yiap, B., Cai Ping, H. & Hua Erin Lim, S. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol J* 2014; 8: 6–14.
- <sup>58</sup> Steflitsch, W., Wolz, D., Buchbauer, G. & Bernath-Frei, B. *Aromatherapie in Wissenschaft Und Praxis. Zeitschrift für Phytotherapie* (Wiggensbach: Stadelmann, 2022). vol. 42.
- <sup>59</sup> Sweeney, M., Papich, M. & Watts, J. New interpretive criteria for danofloxacin antibacterial susceptibility testing against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* associated with bovine respiratory disease. *J Vet Diagn Invest* 2017; 29: 224–227.
- <sup>60</sup> Tisserand, R. & Rodney, Y. *Essential Oil Safety – A Guide for Health Care Professionals*. (2013).
- <sup>61</sup> Vogel, G., Nicolet, J., Martig, J., Tschudi, P. & Meylan, M. Kälberpneumonien: Aktualisierung des Erregerspektrums und der der Resistenzlage gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2001; 143: 341–350.
- <sup>62</sup> Wabner, D. & Beier, C. *Aromatherapie – Grundlagen, Wirkprinzipien*. (Urban und Fischer Verlag, Elsevier, München, 2011).
- <sup>63</sup> Zhang, S. *et al.* Fennel main constituent, trans-anethole treatment against LPS-induced acute lung injury by regulation of Th17/Treg function. *Mol Med Rep* 2018; 18: 1369.

## Korrespondenzadresse

Jens Becker  
Wiederkäuferklinik der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern  
Bremgartenstrasse 109a  
CH-3012 Bern  
Telefon: +41 31 684 22 46  
E-Mail: jens.becker@unibe.ch