

Zastosowanie olejku tymiankowego do przeciwdrobnoustrojowego wykończenia materiałów skórzanych

The use of thyme oil for the antimicrobial finish of leather materials

Dorota Gendaszewska^{1*}, Barbara Wionczyk¹, Paweł Boniecki², Agata Bednarek²

¹ Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Przemysłu Skórzanego,

² Innogrants Sp. z o.o.

Abstrakt

Olejki eteryczne ze względu na swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym. Z uwagi na powszechną dostępność olejków eterycznych, ich wysoką skuteczność przeciwdrobnoustrojową oraz bezpieczeństwo, związki te są rozpatrywane również jako zielona alternatywa dla środków ochrony garbowanej skóry. Celem pracy było wyznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej garbowanych skór bydlęcych zmodyfikowanych olejkiem tymiankowym w stężeniu 5%. Skóry modyfikowane olejkiem eterycznym wywoływały silny efekt przeciwgrzybiczy w odniesieniu do grzybów *Ch. globosum* oraz zadowalający lub dobry efekt przeciwbakteryjny w odniesieniu do bakterii *E. coli*. Zastosowanie do modyfikacji skór olejku tymiankowego w postaci 5% może być alternatywą dla biocydów stosowanych w garbarstwie. Potrzeba jednak dalszych badań m.in. w zakresie wpływu badanego olejku na jakość skór w dłuższym okresie czasu.

Abstract

Due to their antimicrobial properties, essential oils are widely used in the cosmetics, pharmaceutical and food industries. Due to the widespread availability of essential oils, their high antimicrobial efficacy and safety, these compounds are also considered a green alternative to tanned leather protection products. The aim of the study was to determine the antimicrobial activity of tanned cattle hides modified with thyme oil at a concentration of 5%. Skins modified with essential oil caused a strong antifungal effect against *Ch. globosum* and a satisfactory or good antimicrobial effect against *E. coli*. The use of thyme oil in the form of 5% for modification of skins may be an alternative to biocides used in tanning. However, further research is needed, e.g. in terms of the influence of the tested oil on the quality of leathers over a longer period of time.

Słowa kluczowe: olejki eteryczne, aktywność przeciwdrobnoustrojowa, skóra, mikroorganizmy

Keywords: essential oils, antimicrobial activity, leather, microorganisms

*autor korespondencyjny: dr inż. Dorota Gendaszewska: d.gendaszewska@ips.lodz.pl

1. Wstęp

Olejki eteryczne są to zawarte w roślinach wieloskładnikowe mieszaniny związków lotnych, głównie węglowodorów oraz ich tlenowych pochodnych, takich jak alkohole, aldehydy, ketony, estry, fenole czy tlenki. Jedną z najczęściej stosowanych metod otrzymywania olejków z roślin jest destylacja z parą wodną. Mniej powszechne metody to tłoczenie na zimno oraz ekstrakcja [1, 2]. W zależności od rodzaju i ilości zawartych związków, olejki eteryczne wykazują różne właściwości, m.in. hamują wzrost drobnoustrojów zakaźnych, zapobiegają rozwojowi grzybów czy łagodzą stany zapalne. Mechanizm działania olejków eterycznych nie został do końca poznany. Wiadomo, że rodzaj drobnoustroju i struktura ściany komórkowej determinują sposób działania olejku eterycznego [3]. W przypadku bakterii Gram-ujemnych odnotowano oporność na większość olejków eterycznych. Tego rodzaju bakterie charakteryzują się hydrofilową powierzchnią komórki, która jest swego rodzaju barierą zapobiegającą wnikaniu hydrofobowych makrocząsteczek. Jednakże niektóre składniki olejków o charakterze fenolowym, mogą powodować rozerwanie zewnętrznej warstwy lipopolisacharydowej, co wywoła częściową dezintegrację tej warstwy. Mechanizm działania olejków eterycznych w przypadku grzybów i bakterii Gram-dodatnich ma nieco inny przebieg, gdyż dochodzi do przzerwiania ciągłości ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej drobnoustrojów. W konsekwencji prowadzi to do wycieku cytoplazmy i w efekcie do śmierci komórki [4]. Co więcej potwierdzono, że związki te hamują syntezę DNA i RNA, białek oraz polisacharydów w komórkach zarówno bakterii jak i grzybów [5].

Olejki eteryczne ze względu na swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe, ale również przeciwutleniające, znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym [1, 6, 7]. Poza tym, są przedmiotem wielu opracowań naukowych [6, 7, 9]. Sirivative i wsp. (2012) badali

możliwość wykorzystania olejków eterycznych *Thymus vulgaris* jako alternatywnego środka konserwującego do skór garbowanych chromowo. Podczas badań stwierdzono, że działanie przeciwbakteryjne olejków eterycznych tymianku zależy od ich składu chemicznego i stężenia, które nie powinno być niższe niż 3%. Zastosowanie stężenia równego 0,05% i 1,0% nie wywoływało strefy zahamowania wzrostu, chociaż próby skóry pozostały odporne na wybrane bakterie [6]. W pracy Falkiewicz-Dulik udowodniono natomiast, że preparat z olejku z drzewa herbacianego wykazuje dobre działanie przeciwbakteryjne w stosunku do *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* oraz działanie biobójcze wobec drożdży *Candida albicans* i grzybów pleśniowych *Aspergillus brasiliensis* [8]. Biorąc pod uwagę powszechną dostępność olejków eterycznych, ich wysoką skuteczność oraz bezpieczeństwo, związki te mogą być alternatywą dla chemicznych środków ochrony wyprawionej skóry.

W związku z powyższym, celem pracy było wyznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyprawionych (gotowych) skór bydlęcych zmodyfikowanych olejkami tymiankowym. Wyniki wcześniejszych prac pozwoliły na wytypowanie, spośród przebadanych związków, olejku tymiankowego w postaci 5% roztworu jako skutecznego środka hamującego wzrost grzybów [10]. Niniejsze badania wykonano w ramach projektu zrealizowanego dla PPHU "REVOLT" ZBIGNIEW ROŻNIATA, pt. „Opracowanie i sprawdzenie w skali pilotażowej innowacyjnej metody natłuszczania gotowych skór galanteryjnych, mającej na celu zwiększenie ich elastyczności, miękkości i higieniczności” umowa o dofinansowanie nr RPLD.01.02.02-10-0030/19-00”.

2. Materiały i metody

2.1. Materiały

Do badań wybrano 100% czysty olejek tymiankowy pozyskany metodą destylacji z parą wodną (CHDL SA, Indie). Olejek tymiankowy jest bezbarwną, czerwonawą lub żółtą cieczą o silnym aromatycznym zapachu tymianku. Głównymi składnikami olejku są tymol (do 55%), cymen (15–28%), linalol (4–6,5%) i karwakrol (1–4%) [11]. Badaniom poddano trzy różne wyprawione skóry bydlęce nasączone mieszaniną zawierającą w odpowiednim stosunku wagowym środek natłuszczający, metoksypropanol, wodę oraz 5% olejek tymiankowy. Mieszanina olejku ze środkiem natłuszczającym наносzona była na skóry za pomocą wałka gąbkowego. Tak przygotowane skóry przed badaniem były suszone na powietrzu i klimatyzowane przez co najmniej 24 h w warunkach klimatu normalnego, RH=(50±5)%, temp. (23°C±2)°C. Jako próby kontrolne stosowano próby tych samych skór bez ich natłuszczania mieszaniną z dodatkiem olejku eterycznego. Charakterystykę wszystkich badanych prób skór zamieszczono w Tabeli 1.

Tab. 1. Badane próby skór.

Numer skóry	Opis	KOD
V	Skóra bydlęca foliowana w kolorze czarnym	V KON
V	Skóra bydlęca foliowana w kolorze czarnym modyfikowana 5% olejkiem tymiankowym ze środkiem natłuszczającym	V
VI	Skóra bydlęca licowa w kolorze grafitowym	VI KON
VI	Skóra bydlęca licowa w kolorze grafitowym modyfikowana 5% olejkiem tymiankowym ze środkiem natłuszczającym	VI
VII	Skóra bydlęca licowa semianilinowa w kolorze czarnym	VII KON
VII	Skóra bydlęca licowa semianilinowa w kolorze czarnym modyfikowana 5% olejkiem tymiankowym ze środkiem natłuszczającym	VII

2.2. Mikroorganizmy

Do badań mających na celu wyznaczenie właściwości antybakteryjnych użyto dwa wzorcowe szczepy bakterii: *Escherichia coli* ATCC 11229 (*E. coli*) oraz *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 (*S. aureus*). Szczepy bakterii uzyskano z kolekcji czystych kultur, która znajduje się w siedzibie Sieci Badawczej Łukasiewicz-Instytucie Przemysłu Skórzanego w Łodzi. Do badań właściwości przeciwwgrzybiczych zastosowano szczep *Chaetomium globosum* ŁOCK 0476 (*Ch. globosum*) pochodzący z Łódzkiego Ośrodka Czystych Kultur (ŁOCK 105) w Łodzi.

2.3. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej

Aktywność przeciwbakteryjna prób skór nasączonych olejkim tymiankowym w stężeniu 5% została wyznaczona zgodnie z normą „PN-EN ISO 20743:2013 Tekstyliia - Wyznaczanie aktywności antybakteryjnej wyrobów włókienniczych” [12]. Jako próbki kontrolne stosowano czyste próby skór (bez naniesionego olejku). Za pomocą szablonu wycięto próby w kształcie koła o średnicy 3,8 cm. Analizę wykonano w trzech powtórzeniach. Do badań wybrano szczepy wzorcowe, które były dwukrotnie przesiane na szalki z zestalonym podłożem agarowym. Następnie po jednodniowej inkubacji w 37°C przeniesiono jedną kolonię do roztworu peptonowego. Końcowe stężenie bakterii wynosiło od $1 \cdot 10^6$ do $3 \cdot 10^6$ jtk/ml.

Przebieg eksperymentu: Na powierzchnię zestalonego agaru naniesiono 1 ml zawiesiny organizmów testowych. Na zainokulowane podłoża naniesiono testowane materiały, zgodnie z zasadą jeden badany materiał na jedną szalkę. Próby następnie obciążono 200g wzorcem przez 60 s. W ten sposób przygotowano dwa rodzaje prób: próby przeznaczone do badania bez inkubacji oraz próby przeznaczone do inkubacji (inkubacja 18-24h, 37°C). W przypadku prób bez

inkubacji po procesie transferu zmywano inokulum przy użyciu roztworu płuczącego i określano liczbę drobnoustrojów metodą posiewu na szaliki Petriego z agarem (inkubacja 18-24h, 37°C). Z prób po procesie inkubacji zmywano transferowane inokulum przy użyciu roztworu płuczącego, a następnie określono liczbę drobnoustrojów metodą posiewu wgłębnego na szalki Petriego z agarem (inkubacja 18-24h, 37°C). Skuteczność działania przeciwbakteryjnego (A)

$$A = (lgC_t - lgC_0) - (lgT_t - lgT_0) = F - G \quad (1)$$

określono za pomocą wzoru (1):

gdzie:

A - jest wartością działania przeciwbakteryjnego;

F- jest wartością wzrostu na próbce kontrolnej ($F=lgC_t-lgC_0$);

G - jest wartością wzrostu na próbce do badań antybakteryjnych ($G=lgT_t-lgT_0$);

lgC_t - to logarytm dziesiętny z arytmetycznej średniej liczby bakterii, otrzymanej z trzech próbek kontrolnych po 18 do 24h inkubacji;

lgC_0 - to logarytm dziesiętny z arytmetycznej średniej liczby bakterii otrzymanych z trzech próbek kontrolnych natychmiast po naniesieniu inokulum;

lgT_t - to logarytm dziesiętny z arytmetycznej średniej liczby bakterii otrzymanych z trzech próbek testowych przeciwbakteryjnych po 18h- 24h inkubacji;

lgT_0 - to logarytm dziesiętny z arytmetycznej średniej liczby bakterii otrzymanych z trzech próbek testowych przeciwbakteryjnych zaraz naniesieniu inokulum;

Do oceny przyjęto odpowiedni dla badanych wyrobów system oceny skuteczności antybakteryjnej badanych materiałów według tabeli 2.

Tab. 2. Kryteria oceny skuteczności działania przeciwbakteryjnego [12].

Skuteczność działania przeciwbakteryjnego	Wartość A
Słaba	$A < 1$
Zadowalająca	$1 \leq A < 2$
Dobra	$2 \leq A < 3$
Bardzo dobra	$A \geq 3$

2.4. Badanie aktywności przeciwgrzybiczej

Badanie aktywności przeciwgrzybiczej zostało przeprowadzone zgodnie z normą „PN-EN 14119:2005 Badania tekstyliów - Ocena działania mikrogrzybów. Metoda B1: badania rozwoju grzybów na kompletnym podłożu agarowym; efekt przeciwgrzybiczy” [13]. Testowe grzyby mogą wzrastać na podłożu agarowym i na wyrobie jeśli wyrób nie jest wykończony środkiem przeciwgrzybiczym. Wpływ działania stosowanych w badaniu grzybów oceniany jest za pomocą określenia szybkości ich wzrostu. Do analiz użyto po dwie próby o wymiarach 2 cm x 8 cm z każdego rodzaju badanej skóry. Zarodniki przygotowano zgodnie z normą [13].

Przebieg eksperymentu: W pierwszej kolejności przygotowano kompletne podłoże mineralne wg normy [13]. Następnie na gorąco rozpuszczono agar dodany w ilości 20g/l. Na koniec dodano glukozę w ilości 20g/l. Całość sterylizowano w autoklawie w temp. 121°C przez 30 min. Następnie pożywkę rozlano na wcześniej przygotowane szalki Petriego. Ułożono badane próby robocze na zestalonym kompletnym podłożu agarowym. Następnie na powierzchnię każdej próby roboczej równomiernie naniesiono 0,5 ml zawiesiny spor. Inkubację prowadzono przez 14 dni w temperaturze 29°C±1°C. Wzrost grzybów oceniano zgodnie z normą (Tab.3).

Tab. 3. Ocena wzrostu grzybów na próbach roboczych [13].

Stopień wzrostu	Ocena
0 ^a	Brak widocznego wzrostu oceniany pod mikroskopem.
1 ^a	Brak widocznego wzrostu, wyraźnie widoczny pod mikroskopem.
2	Wzrost widoczny, pokrywający do 25% badanej powierzchni.
3	Wzrost widoczny, pokrywający do 50% badanej powierzchni.
4	Znaczny wzrost, pokrywający więcej niż 50% badanej powierzchni.
5	Silny wzrost, pokrywający całą badaną powierzchnię.

a – zahamowanie oznacza „brak wzrostu” w agarze wokół próby roboczej. Niecałkowite zahamowanie (zmniejszony wzrost) nie powinno być oceniane jako zahamowanie. Jeśli wzrost grzybów na agarze w pobliżu próby roboczej jest częściowo zatrzymany, również to zapisać.

3. Wyniki badań i dyskusja

Wyniki dotyczące badań aktywności przeciwbakteryjnej w odniesieniu do *E. coli* przedstawiono w tabeli 4, natomiast w odniesieniu do *S. aureus* pokazano w tabeli 5. Wyniki pokazują, że skuteczność antybakteryjna wobec *E. coli* była zadowalająca (skóra V, A=1,16), dobra (skóra VI, A=2,77) lub słaba (skóra VII, A=0,89). Natomiast skuteczność antybakteryjna wobec *S. aureus* była słaba (skóra V i VII) lub zadowalająca (skóra VI, A=1,55). Można wnioskować, że skóra VI najsilniej hamowała wzrost obu badanych szczepów. *S. aureus* okazał się bardziej wrażliwy niż *E. coli* na zastosowany do modyfikacji skóry olejek tymiankowy. Biorąc pod uwagę fakt, że wszystkie próby skóry były impregnowane w taki sam sposób, różnice w aktywności przeciwbakteryjnej w odniesieniu do tych samych szczepów mogą wynikać, np. obecności różnych substancji wprowadzonych do skór podczas procesów ich wyprawy. Próby badanych skór mają różne zabarwienie, co może wpływać również na ich skuteczność antybakteryjną. Dane literaturowe wskazują, że niektóre barwniki, m.in. te naturalne wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe [14, 15]. Obecność barwników w skórze może wzmocnić lub osłabić efekt przeciwbakteryjny.

Tab. 4. Skuteczność działania przeciwbakteryjnego (A) badanych prób skór z naniesionym olejkiem tymiankowym względem szczepu *Escherichia coli* ATCC 11229

Material	Liczba bakterii [jtk/ml]				Wyznaczone parametry		
	C ₀	C _t	T ₀	T _t	F	G	A
V	1,03E+09	1,53E+10	1,80E+02	1,84E+02	1,17	0,01	1,16
VI	6,75E+09	1,40E+10	2,84E+02	1,00E+00	0,32	-2,45	2,77
VII	3,41E+09	3,50E+07	2,55E+02	3,33E-01	-1,99	-2,88	0,89

Tab. 5. Skuteczność działania przeciwbakteryjnego (A) badanych prób skór z naniesionym olejkim tymiankowym względem szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 9144.

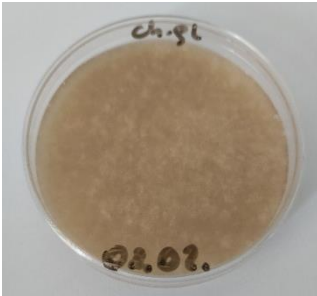
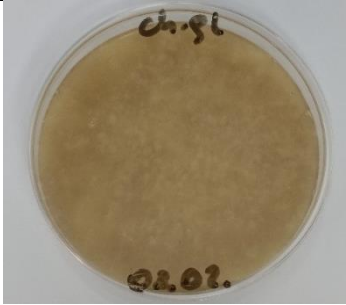
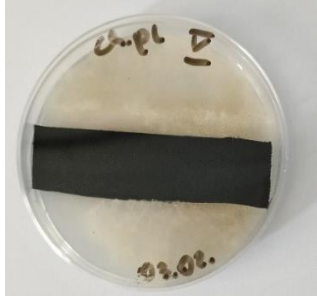
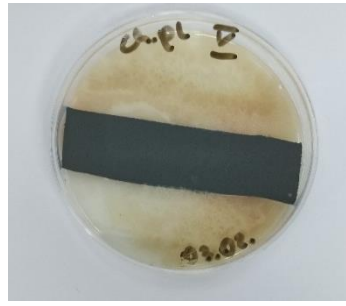
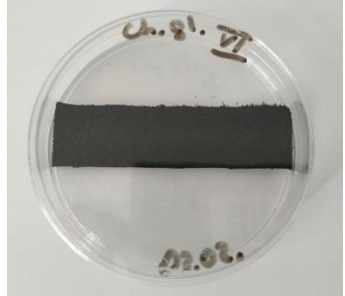
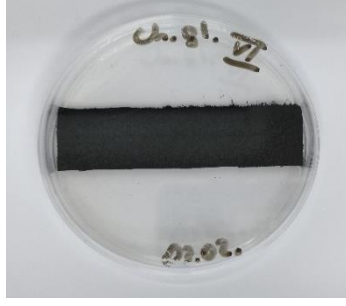
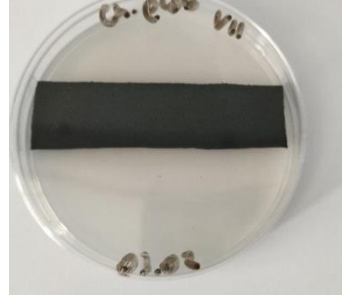
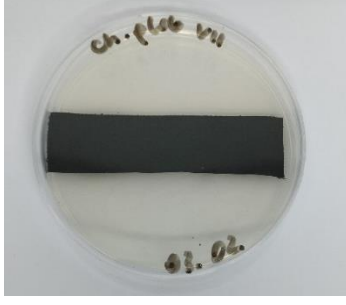
Material	Liczba bakterii [jtk/ml]				Wyznaczone parametry		
	C ₀	C _t	T ₀	T _t	F	G	A
V	5,00E+07	5,00E+06	1,50E+07	5,00E+06	-1,26	-0,48	-0,78
VI	6,00E+07	5,00E+06	4,25E+09	5,00E+06	-1,38	-2,93	1,55
VII	7,00E+07	5,00E+06	5,00E+06	5,00E+06	-0,60	0,00	-0,60

Wyniki badań aktywności przeciwgrzybiczej w odniesieniu do *Ch. globosum* ŁOCK 0476 przedstawiono w tabeli 6 i 7. Grzyby *Ch. globosum* rosną w postaci kremowej grzybni na powierzchni pożywki agarowej w miejscu naniesienia zawiesiny zarodników. Nie zaobserwowano wzrostu badanych grzybów na próbach V, VI, VII, co oznacza silne działanie przeciwgrzybicze zastosowanego olejku eterycznego. Wzrost pleśni zaobserwowano jedynie na podłożu agarowym wokół próby nr V, natomiast na samej próbce nie odnotowano wzrostu mikroorganizmów. Oznacza to, że olejek tymiankowy w stężeniu 5% zapewnia skuteczną ochronę przed wzrostem grzybów pleśniowych na skórkach wyprawionych, które mogą być przeznaczone np. na galanterię skórzaną.

Tab. 6. Wyniki aktywności przeciwgrzybiczej badanych prób skór modyfikowanych olejkim tymiankowym na działanie *Chaetomium globosum*.

Symbol próbki	Stopień wzrostu	Ocena wzrostu	Ocena badanego materiału
<i>Chaetomium globosum</i>	5	Silny wzrost, pokrywający całą badaną powierzchnię.	-
V	0	Brak widocznego wzrostu - oceniany pod mikroskopem.	Efekt grzybostatyczny
VI	0	Brak widocznego wzrostu - oceniany pod mikroskopem.	Efekt grzybostatyczny
VII	0	Brak widocznego wzrostu - oceniany pod mikroskopem.	Efekt grzybostatyczny

Tab. 7. Wzrost *Chaetomium globosum* na agarze i badanych próbach skóry z naniesionym olejkim tymiankowym [źródło: opracowanie własne].

Symbol próby	Tydzień 1	Tydzień 2
<i>Chaetomium globosum</i>		
V		
VI		
VII		

Silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku tymiankowego potwierdzają doniesienia literaturowe [16-18]. Wyniki przedstawione w pracy Chirila *et al.* pokazały, że olejek tymiankowy wykazywał wysoką aktywność przeciwgrzybiczą wobec *Candida albicans* i *Aspergillus niger* [16]. Co więcej badania pokazują, że olejek tymiankowy działa hamująco na patogenne bakterie *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus* [18]. Za właściwości antydnobnoustrojowe odpowiadają głównie związki o charakterze fenolowym takie jak karwakrol i tymol, które mogą powodować rozerwanie zewnętrznej warstwy lipopolisacharydowej w przypadku bakterii Gram-ujemnych oraz przerwanie ciągłości ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej w przypadku bakterii Gram-dodatnich i grzybów [4].

4. Podsumowanie

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem substancji o właściwościach bio- i grzybobójczych substancjami pochodzenia naturalnego z powodu ich większej dostępności, mniejszej toksyczności oraz lepszej biodegradowalności w porównaniu z dostępnymi na rynku syntetycznymi biocydami [5]. Dodatkowo, liczne badania potwierdzają działanie antydnobnoustrojowe i antyutleniające olejków eterycznych wobec dużej grupy mikroorganizmów. Fakt ten potwierdzają także badania wykonane w niniejszej pracy, które wskazują, że olejki eteryczne mogą być zastosowane, m.in. do modyfikowania przeciwdrobnoustrojowego skór przeznaczonych, np. na galanterię skórzaną. W ten sposób będzie zapewniona nie tylko ochrona przed rozwojem patogenów, ale także zwiększy się komfort użytkowania takich wyrobów. W niniejszej pracy wykazano, że skóry garbowane chromowo modyfikowane olejkim tymiankowym w stężeniu 5% wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Stwierdzono, że zastosowanie olejku eterycznego w takim stężeniu wywołało silny efekt przeciwgrzybiczy w odniesieniu do grzybów

Chaetomium globosum ŁOCK 0476 oraz zadowalający lub dobry efekt przeciwbakteryjny szczególnie w odniesieniu do bakterii *Escherichia coli* ATCC 11229. Zatem podsumowując, zastosowanie w procesie wyprawy do modyfikacji skór olejków eterycznych pochodzenia naturalnego, np. olejku tymiankowego w stężeniu 5% może być pewną alternatywą dla powszechnie stosowanych syntetycznych środków bakterio- i grzybobójczych ochrony skóry.

Niniejsze badania wykonano w ramach projektu zrealizowanego dla PPHU "REVOLT" ZBIGNIEW ROŻNIATA, pt. „Opracowanie i sprawdzenie w skali pilotażowej innowacyjnej metody natuszczania gotowych skór galanteryjnych, mającej na celu zwiększenie ich elastyczności, miękkości i higieniczności”, umowa o dofinansowanie nr RPLD.01.02.02-10-0030/19-00”.

Literatura

- [1] Gendaszewska D.: *Fungistatyczne działanie olejków eterycznych w żywności w warunkach modelowych*, Praca magisterska, Politechnika Łódzka, Łódź, 2010.
- [2] Niculescu O., Leca M., Moldovan Z., Deselnicu D.C.: *Obtaining and characterizing a product with antifungal properties based on essential oils and natural waxes for finishing natural leathers*, *Revista de Chimie* **66** (11), 2015, str. 1733-1736.
- [3] Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M.: *Nowe syntetyczne i naturalne antymykotyki w kontekście terapii dermatomykoz*, *Postępy mikrobiologii – advancements of microbiology* **59**, 1, 2020, str. 63–74.
- [4] Fisher K., Phillips C.A.: *The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems*, *Journal of Applied Microbiology* **101**, 2006, str. 1232-1240.
- [5] Kalemba D., Kunicka-Styczyńska A.: *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*, *Current Medicinal Chemistry* **10**, 2003, str. 813-829.
- [6] Sirvaityte J, Šiugždaitė J, Valeikac V, Dambrauskienė E.: *Application of essential oils of thyme as a natural preservative in leather tanning*, *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* **61**(3), 2012, str. 220–227.
- [7] Edris A.E.: *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review*, *Phytotherapy Research* **21**, 2007, str. 308–323.
- [8] Falkiewicz – Dulik M.: *Biocidal Activity of Selected Preparations for Leather Protection*, *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe* **28**, **1**(139), 2020, str. 115-122.

- [9] Bayramoğlu E.E., Gülümser G., Karaboz I.: *Ecological and innovate fungicide for the leather industry: essential oil of Origanum minutiflorum*. Journal of the American Leather Chemists Association **101(3)**, 2006, str. 96-104.
- [10] Gendaszewska D., Wionczyk B., Bednarek A., Boniecki P.: *Aktywność fungistatyczna skór bydlęcych zawierających wybrane olejki eteryczne*, III Ogólnopolska konferencja Gospodarka o Obiegu Zamkniętym, 2021.
- [11] Kowalczyk A., Przychodna M., Sopata S., Bodalska A., Fecka I.: *Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications*, Molecules **25(18)**, 2020, str. 4125.
- [12] PN – EN ISO 20743:2013 – 10 Wyznaczanie aktywności antybakteryjnej wyrobów gotowych z wykończeniem antybakteryjnym.
- [13] PN – EN 14119:2005 pkt 10.5 (B2) Aktywność antygrzybicza – Test dyfuzyjny na agarze.
- [14] Kasiri M. B., Safapour S.: *Natural dyes and antimicrobials for green treatment of textiles*, Environmental Chemistry Letters **12**, 2014, str. 1-13.
- [15] Nathan V.K., Rani M.E., Rathinasamy G., Dhiraviam K.N.: *Antioxidant and Antimicrobial Potential of Natural Colouring Pigment Derived from Bixa orellana L. Seed Aril*, Proceedings of the National Academy of Sciences **89**, 2019, str. 137–143.
- [16] Chirila C., Deselnicu V., Berechet M.D.: *Footwear protection against fungi using thyme essential oil*, Leather and Footwear Journal **17(3)**, 2017; str. 173-178.
- [17] Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z., Naghdibadi H.: *Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against Aspergillus flavus in liquid medium and tomato paste*, Food Control **18(12)**, 2007: 1518-1523.
- [18] Arnal-Schnebelen B., Hadji-Minaglou F., Peroteau J-F., Ribeyre F., de Billerbeck V.G.: *Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases*, The International Journal of Aromatherapy **14**, 2004, str. 192-197.