

Reinhaltung der Innenraumluft und Hygienisierung von Lüftungsanlagen mit ätherischen Ölen

M.-C. Pibiri ^{a,*}, A. Goel ^b, N. Vahekeni ^c, C.-A. Roulet ^a

^aLESO-PB, Swiss Federal Institute of Technologies EPFL, Lausanne, Schweiz

^bIndian Institute of Technology (IIT), Neu-Delhi, Indien

^cLaboratorium für Mikrobiologie, Universität Neuchâtel, Schweiz

SCHLAGWÖRTER

Innenraumluft

Lüftungsanlagen

Luftübertragene Mikroorganismen

Ätherische Öle

Lüftungsanlagen sind häufig mit Bakterien und Pilzen behaftet, die gesundheitliche Gefahren für den Menschen bergen können. Die Ausbreitung von Mikroben kann unter anderem durch den Einsatz ätherischer Öle verhindert werden. Diese aromatischen Pflanzenextrakte bilden die Grundlage zahlreicher traditioneller Heilmethoden und wurden auch auf ihre medizinische Bedeutung ausführlich untersucht, wobei ihre Wirksamkeit bei der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen nachgewiesen ist.

Im Gegensatz zu den meisten antimikrobiellen Substanzen, die gegenwärtig für die Luftdesinfektion eingesetzt werden, weisen ätherische Öle eine nur geringe Toxizität auf. Zur Sondierung einer Methode zur Reinhaltung der Innenraumluft anhand der keimtötenden und wohlriechenden Eigenschaften ätherischer Öle haben wir einen pathogenen, also krankheitserregenden Prüfkeim ausgewählt und dabei die Vorgaben der Norm AFNOR NF T72-281 befolgt. Vorliegendes Protokoll bewertet die Wirksamkeit der Oberflächendesinfektion durch flüchtige antimikrobielle Substanzen, d. h. der Eliminierung von Schadstoffen wie Bakterien, Pilzen und Sporen. Angewandt wurde das Protokoll auf eines der aktivsten ätherischen Öle, das Bergbohnenkraut, sowie auf die 40 %ige Formaldehydlösung Formol, ein in Kliniken gebräuchliches chemisches Desinfektionsmittel. Wir haben nachgewiesen, dass die gasförmige Phase des ätherischen Öls aus dem Bohnenkraut das Bakterium *Staphylococcus aureus* abtötet und nahezu dieselbe Reduzierung der Bakterienzahl erzielt wird wie mit der Gesamtdesinfektion mit evaporiertem Formol.

© 2006 Elsevier Ltd. Alle Rechte vorbehalten.

Praktische Erwägungen

In Innenräumen könnte die kontrollierte Durchdringung streng ausgewählter ätherischer Öle in flüchtiger Form je nach zeitlicher Konzentration folgende Vorteile bringen: 1. Vorbeugung gegen mikrobielle Belastung

2. mikrobiologische Hygienisierung von Lüftungsanlagen und bei Bedarf Desinfektion

3. Förderung von Gesundheit, Wohlbefinden und Produktivität anwesender Personen, da neben der Lufttemperatur und der Luftfeuchtigkeit auch Gerüche oder Düfte die allgemeine Wahrnehmung der Luftqualität in Innenräumen beeinflussen

* Verantwortlicher Verfasser Tel.: +41 21 693 55 77; Fax: +41 21 693 27 22.

E-Mail: marie-cecile.pibiri@epfl.ch (M.-C. Pibiri)

0962-4562/\$ - siehe Titelseite © 2006 Elsevier Ltd. Alle Rechte vorbehalten.

doi:10.1016/j.ijar.2006.10.002

Einleitung

Zahlreiche Studien (Bluyssen et al., 2002; Flückiger, 1999; Burge, 1995) haben ergeben, dass in mechanischen Lüftungsanlagen viele Keime, Bakterien, Pilze und Schimmelarten zu finden sind, die sich demnach auf die gesamte Gebäudehülle ausbreiten.

Diese luftübertragenen Mikroorganismen können mit gesundheitlichen Nachteilen für die anwesenden Personen verbunden sein. Dieses Problem ist in Krankenhäusern besonders akut, denn dort reagieren die Patienten empfindlicher auf diese Art mikrobiologischer Belastungen (Bardana und Anthony, 1996). Eine empfohlene Methode zur deutlichen Reduzierung von Mikroorganismen in Lüftungsanlagen liegt darin, diese Systeme entsprechend zu konstruieren und alle Teile während des Baus und der Nutzung absolut sauber zu halten (Bluyssen et al., 2002). Dies geschieht jedoch selten, so dass sich der Schmutz auf den Oberflächenteilen der mechanischen Lüftungsanlagen ablagert und sich dort in der Folge Mikroorganismen einnisten können. Als Extrakt aus verschiedenen Pflanzenteilen haben ätherische Öle interessante Eigenschaften. Für die therapeutische Anwendung sind sie gut erforscht. Je nach ihrer Zusammensetzung ist die Wirkung unter anderem antibakteriell, antifungisch, antiviral, sedativ, antispasmodisch oder antiinflammatorisch (Franchomme und Pénoël, 1990; Schnaubelt, 1998; Baudoux, 2000). Einige ätherische Öle hemmen die metabolischen Funktionen von Mikroorganismen wie Wachstum und Vermehrung (Hermal, 1993; Dusart, 1998). Studien haben ergeben, dass gewisse Bestandteile abtötend auf Mikroorganismen wirken (Carson und Riley, 1995; Helander et al., 1998; Cox et al., 2000; Lambert et al., 2001; Kunle, 2003; Walsh et al., 2003).

Auf der anderen Seite ist die Verträglichkeit dieser ätherischer Öle beim Menschen anhand experimenteller Daten gut beschrieben. Allergischen Reaktionen oder Vergiftungserscheinungen liegt oft ein Anwendungsfehler zugrunde, beispielsweise bei zu hohen Konzentrationen oder ausgedehntem Kontakt. Zudem ergeben sich solche Nebenwirkungen meist durch Hautkontakt oder Verschlucken, was in der Praxis leicht vermieden werden kann (Pibiri, 2005). Da die Erforschung der ätherischen Öle sich weitgehend auf medizinische und pharmazeutische Anwendungen konzentriert, basiert die Beschreibung der aktiven Wirkung hauptsächlich auf der flüssigen Phase. Zwar sind Anwendungen der gasförmigen Phase der ätherischen Öle in der Luft recht verbreitet, und es wurden offiziell auch keine Einschränkungen erlassen, wissenschaftliche Studien sind jedoch dünn gesät. Dazu kommt, dass die Ergebnisse der durchgeführten Studien aufgrund der Vielzahl angewandter Protokolle nicht miteinander vergleichbar sind. Derzeit wird die Verdunstungsaktivität ätherischer Öle mit der "mikroatmosphärischen Methode" bestimmt, einer Erweiterung der Agardiffusionsmethode mit "Aromatogrammen" (Antibiogramme mit ätherischen Ölen) (Belaiche, 1979). Für ein erstes Screening zur Auswahl aktiver ätherischer Öle im Zusammenhang mit bestimmten Mikroorganismen ist diese Methode sehr hilfreich (Pibiri, 2005). Die quantitative Auslegung ist jedoch problematisch, und zur großangelegten Anwendung ist sie nicht geeignet, da die Versuchsbedingungen zu sehr von den tatsächlichen Gegebenheiten in Lüftungsanlagen abweichen. Vielsprechende Ergebnisse lieferten neuere Studien, die mit größervolumigen Bioreaktoren (1,3 bis 16 Liter) durchgeführt wurden (de Billerbeck, 2000; Inouye, 2003a,b). In beiden Fällen waren die Mikroorganismen einem Nährboden aufgelagert, der der Situation in Gebäudeumgebungen nicht entspricht. Als ganzheitlichen Ansatz für die Mikrobiologie der Innenraumlufte und die Verwendung von ätherischen Ölen als antimikrobiellen Substanzen schlagen wir die nachfolgend beschriebene Methode vor.

Methode

Zum Nachweis der Aktivität der gasförmigen Phase ätherischer Öle wählten wir die französische Norm NF T72-281: Methoden der Oberflächendesinfektion zur Eliminierung luftübertragener Keime. Bestimmung der bakteriziden, fungiziden und sporiziden Wirksamkeit (AFNOR, 1986). Die Versuche bestehen aus Herstellung und Quantifizierung des Desinfektionspotenzials einer antimikrobiellen Substanz, die nach einer gewissen Zeit bei kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit unter realitätsnahen Bedingungen in der gasförmigen Phase auf Flächen aufgebracht wird. Das Protokoll ist in zwei Schritte gegliedert. Inerte und sterile Träger (in unserem Fall Uhrglas) werden in einem luftdichten Bioreaktor eine Zeit lang mit ätherischen Ölen benebelt. Nach der vorgegebenen Kontaktdauer werden die einzelnen Uhrgläser entnommen und in eine Lösung mit Referenzbakterien (vorgegebene Konzentration) getaucht.

Weitere Tests sind nur möglich, wenn die Bakterienkonzentration in jeder Lösung konstant bleibt. Die Vorversuche sind erforderlich, um festzustellen, ob das Normenprotokoll mit den geprüften antimikrobiellen Substanzen befolgt werden kann. Sie dienen der Feststellung einer möglichen Restaktivität der antimikrobiellen Substanz, die die in den Tests gemessene Wirkung während der Protokollmanipulation störend beeinflussen könnte.

Der zweite Schritt ist dann der eigentliche Test. Die Versuche sind ihren Vorgängern ähnlich, außer dass die ausgewählten Mikroorganismen auf dem Uhrglas immobilisiert werden. Die Uhrgläser werden nach einer vorgegebenen Kontaktdauer in eine sterile Lösung getaucht.

¹kann von der AFNOR-Website abgerufen werden (www.afnor.fr).

Reinhaltung der Innenraumluft und Hygienisierung von Lüftungsanlagen mit ätherischen Ölen

151

Die Auszählung dieser Lösung ergibt die Anzahl verbleibender Bakterien nach der Desinfektion. Die erreichte Desinfektionsrate entspricht dem logarithmischen Wert d unter Anwendung folgender Gleichung:

$$d = \log n_{\text{ref}} - \log n_{\text{ex}} \quad (1)$$

Dabei gilt:

n_{ref} ist die Durchschnittskonzentration [KBE/ml] der in einer Salzlösung von den Referenzträgern extrahierten Kolonien.

n_{ex} ist die Durchschnittskonzentration [KBE/ml] der in einer Salzlösung von den exponierten Trägern extrahierten Kolonien. Die Extraktion wird als vollständig angesehen, die verbleibenden Bakterien auf dem Träger bleiben außer Acht.

Versuchsordnung

Als Reaktor für diese Versuche (Fig. 1) dient ein luftdichter und sterilisierter Behälter aus Polycarbonat mit einem Fassungsvermögen von 7 Litern. Bakterielle Inokuli werden auf inerte Träger aufgebracht (sterilisiertes, ölfreies Uhrglas, Durchmesser 40 mm), die wiederum mit der präparierten Seite nach unten auf einem eigens angefertigten Aluminiumträger positioniert werden. Dieser Träger wird unter sterilen Bedingungen in einen Bioreaktor gelegt und während verschieden langen Expositionszeiten (2 bis 4 Stunden) dem mit steriler Luft verdünnten Nebel antimikrobieller Substanzen ausgesetzt. Gasförmige Phasen ergeben sich aus der partiellen Verdunstung von 50 Mikrolitern der antimikrobiellen Substanzen, die zuvor in der flüssigen Phase auf Filterpapier getropft (Durchmesser 50 mm) und zur schnellen Verdunstung (und Homogenisierung der Luft) im Bioreaktor vor einen kleinen Ventilator mit 6 V gehalten wurden.

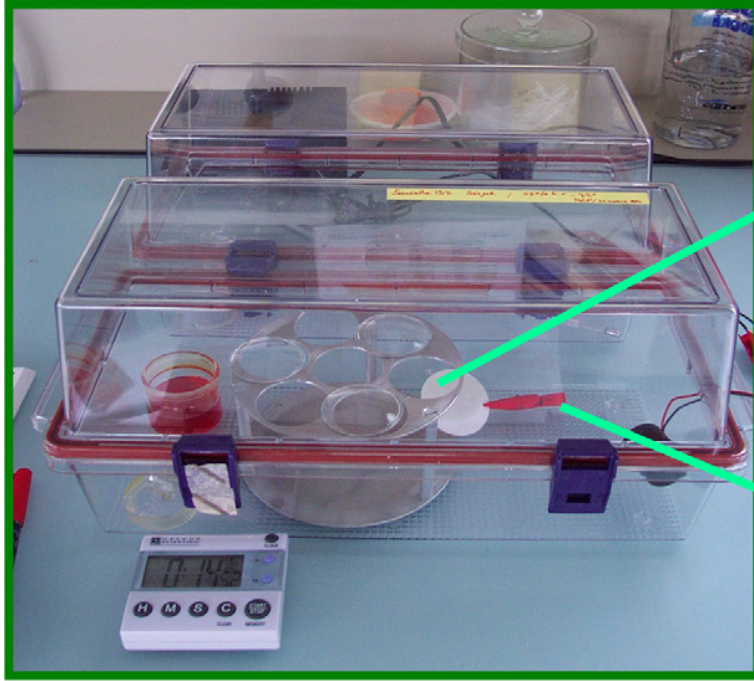
Innentemperatur und relative Luftfeuchtigkeit werden bei ca. 21°C bzw. 50 % konstant gehalten, was den atmosphärischen Bedingungen entspricht, die durch die Klimaanlage im Labor geschaffen werden und deren Stabilität im Vorfeld geprüft wurde.

Bakterienstamm und Suspensionsmedium

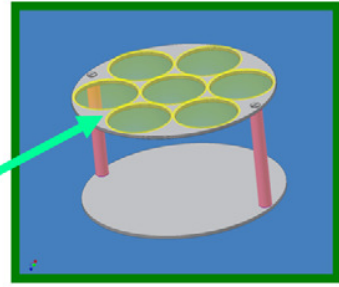
Für die Versuche wurde ein in der europäischen Norm EN 1040 empfohlener Prüfstamm mit bakterizider Wirkung gemäß der ersten Desinfektionsrate (CEN, 1997) ausgewählt: *Staphylococcus aureus* (DMS 799, ATCC 6538). Kulturen wurden nachgebildet und auf Trypton-Soja-Agar (TSA, Oxoid) ausgezählt. Mikrobielle Suspensionen verdünnt in steriler Salzlösung (NaCl 0,85 % w/v) wurden an eine optische Dichte von $0,2 \pm 0,05$ (WPA Biowave Zelldichtemesser CO8000) angepasst, um Inokuli mit 10^7 Zellen/ml zu erzielen. Eine Kombination aus Trypton-Soja-Bouillon (TSB, Oxoid) 1/5 (v/v) wurde zugesetzt, um eine Austrocknung der Bakterien während der Versuche zu verhindern.

Antimikrobielle Substanzen

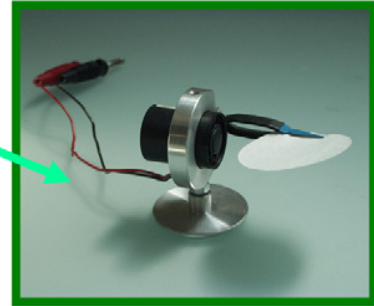
Mehr als 60 ätherische Öle wurden im Vorfeld mittels Aromatogrammen und mikroatmosphärischen Methoden auf ihre bakteriziden Eigenschaften untersucht. Unter anderem fiel unsere Wahl auf ein hochphenolisches ätherisches Öl (Carvacrol 47 %, Thymol 2 %), das Bergbohnenkraut (*Satureja montana*, Aries S.A.). Als chemische Referenz für diese Versuchsreihe diente eine Lösung aus Formaldehyd 40 % (Fluka 47629), allgemein bekannt unter der Bezeichnung Formol.



a



b



c

Abbildung 1. Bioreaktor (a) mit Uhrglasträger aus Aluminium (b) und Verdunster (c)

Ergebnisse

Die Vorversuche ergaben keine Restaktivität möglicher Spuren von auf den inerten Trägern adsorbierten ätherischen Ölen, so dass das Experiment fortgesetzt werden konnte.

Die Expositionszeit von 240 Minuten wurde halbiert und so die Aktivität nach einem kürzeren Zeitraum geprüft. Die Ergebnisse (Tabelle 1) zeigen, dass Formol sowohl nach 120 als auch nach 240 Minuten eine vollständige bakterizide Aktivität aufweist, während beim Bohnenkraut lebensfähige Bakterien noch vorhanden sind. Nach einer Expositionszeit von 120 Minuten beträgt die Bakterienkonzentration 94 [KBE/ml], nach 240 Minuten nur noch 0,5 [KBE/ml]. In diesem Fall liegt die Desinfektionsrate $d = 5,3$ über dem Mindestwert 5, der in der französischen Norm NF 72-281 zur bakteriziden Aktivität gefordert wird. Tabelle 2 zeigt die entsprechende Konzentration im Bioreaktor, die zur Desinfektion sowohl mit Formol (vollständige Verdunstung) als auch mit Bohnenkraut (partielle Verdunstung) in einer Expositionszeit von 2 Stunden erforderlich ist.

Die Konzentration des Formaldehyds ist um das 2,7fache höher als die des Bohnenkrauts.

Diskussion

Die zur vollständigen Desinfektion erforderliche Formaldehydkonzentration beträgt 1500 bis 3250 ppm bei einer Expositionsvernebelung von 2 Stunden (Fleurette et al., 1995). Zum Vergleich sind Formaldehydkonzentrationen im Freien sehr niedrig und betragen zwischen 24 und 480 ppb, beim Menschen tritt der Tod bei einer Konzentration von 150 ppm in 10 Minuten ein. Die Formaldehyddiffusion in der Luft gilt dank des großen Aktivitätsspektrums und der hervorragenden Luftdurchdringung zwar als das wirkungsvollste Desinfektionsmittel, es wirkt jedoch auch korrosiv und toxisch. Jede Anwendung erfordert abschließend eine vollständige Neutralisierung mit bestimmten Substanzen wie Ammoniak (die wiederum ebenfalls gewissen Risiken bergen). Daher wird es in Frankreich und der Schweiz zur Desinfektion im Krankenhausbereich nicht mehr eingesetzt. Da die unseren Versuchen zugrunde gelegte Konzentration von 1900 ppm im menschlichen Umfeld völlig indiskutabel ist, gewinnt die Anwendung von Bohnenkraut an Interesse. Wie bereits erwähnt, sind ätherische Öle weitgehend ungiftig. Die Daten zur oralen LD50 liegen zwischen 2 und 5 bzw. >5 g/kg (orale LD50 bei Formaldehyd 260 mg/kg), wobei nach Kenntnis der Autoren in Europa keine Beschränkungen zur Innenraumdiffusion existieren.

Die Expositionsgrenzwerte werden durch die geruchliche Wahrnehmung ätherischer Öle sowie ihre Tolerierung in bewohnten Gebieten bestimmt, wobei eine Konzentration von 700 ppm bereits als hoch anzusehen, jedoch kurzzeitig noch erträglich ist. Ein breiteres Screening von Bakterien und Schimmelarten würde wohl zu einem besseren Verständnis des Potenzials ausgewählter ätherischer Öle in der Luft beitragen. Es ist geplant, weitere pathogene mikrobielle Stämme im Zusammenhang mit verschiedenen Konzentrationen ausgewählter ätherischer Öle und Ölmischungen zu untersuchen. Da ätherische Öle einen recht hohen Siedepunkt aufweisen, wäre es interessant, die Oberflächenadsorption zu beobachten und Mindestkonzentrationen zu sondieren, um die Ausbreitung und Kontaminierung größerer Gebiete durch bestimmte Mikroorganismen zu vermeiden. Wir haben nun zwar eine Desinfektionsmethode vorgestellt, das eigentliche Ziel unseres Projektes besteht jedoch nicht in der Sterilisierung von Volumina, sondern in der Verringerung der Luftbelastung in Innenräumen und in der Verhinderung einer Ausbreitung von Mikroben auf Oberflächen.

Zu diesem Zweck erfolgt in weiteren Versuchsreihen eine Optimierung der Konzentrationen in einer Klimakammer und anschließend die Verifizierung in echten Lüftungsanlagen. Mögliche Anwendungsbereiche sind Lüftungsanlagen, Büros, Einkaufszentren, geschlossene Räume sowie Seniorenwohnheime, Schulen und sogar Krankenhäuser.

Tabelle 1 Desinfektionsrate bei verschiedenen Expositionszeiten

| Expositionszeit | Referenz (KBE/ml) | | | Bohnenkraut (KBE/ml) | | | d | Formol (KBE/ml) | | | |
|-----------------|-------------------|--------|------|----------------------|--------|-----|-----|-----------------|--------|----|------------------|
| | n ^a | Mittel | SD | N | Mittel | SD | | N | Mittel | SD | |
| 120 min | 2 | 42,500 | 1000 | 2 | 94 | 10 | 4.6 | 2 | 0 | – | tot ^c |
| 240 min | 4 | 44,600 | 2000 | 4 | 0.5 | 0.7 | 5.3 | 4 | 0 | – | tot |

^aKoloniebildende Einheiten

^bAnzahl der Erfahrungswerte

^cGesamt desinfektion

Tabelle 2 Desinfektionskonzentration bakterizider Substanzen bei 21°C

| MW (g/mol) | Dichte (g/cm ³) | Verdampftes Volumen (flüssig) (l) | Volumen (Gas) (l) | Konzentration (ppm) |
|------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|
|------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|

| | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|------|------|----|----|---|---|------|-----|
| Formol ^a 30 | | 0.81 | | 50 | | 7 | | 1900 | |
| Bohnenkraut | 145.7 | | 0.89 | | 35 | | 7 | | 700 |

^aFormaldehyd 40 %.

Reinhaltung der Innenraumluft und Hygienisierung von Lüftungsanlagen mit ätherischen Ölen

153

Schlussfolgerungen und Konsequenzen

Für die Untersuchung der Wirksamkeit ätherischer Öle zur Reduzierung bakterieller Belastung empfehlen wir eine standardisierte Methode mit 7-Liter-Bioreaktoren (Pibiri, 2005) gemäß Protokoll der französischen Norm AFNOR NF T72-281 zur Bewertung der Effizienz von Desinfektionsmitteln im klinischen Bereich für die Eliminierung pathogener Stämme. Die keimtötende Wirkung ätherischer Öle durch direkten Kontakt mit festen oder flüssigen Medien ist weitgehend bekannt. Die Wirkung der dampfförmigen Phase wurde nur an einer einzigen Pilzart nachgewiesen, dem *Aspergillus niger*. Wir haben Versuchsanordnungen entwickelt sowie ein Verfahren und Standardstämme bestimmt, mit denen die Wirkung ätherischer Öle und Ölmischungen auf einen pathogenen, grampositiven Stamm - den *Staphylococcus aureus* - bewertet wurde. Ätherische Öle in einer angenehmen Konzentration in der Luft werden von den anwesenden Personen relativ gut angenommen, da es sich um natürliche Auszüge handelt. Dank des angenehmen Duftes haben sie unter Umständen sogar eine positive Auswirkung auf das menschliche Wohlbefinden. Aufgrund der potenziellen Kondensation auf den Oberflächen einer Lüftungsanlage ergibt sich des Weiteren möglicherweise eine bakterio-statische und bakterizide Wirkung.

Danksagung

Die Schweizerische Nationale Stiftung für Naturwissenschaften fördert diese Studie unter der Nummer 2134-065867. Die Autoren sprechen außerdem der Aries S.A. sowie Christophe Perret-Gentil ihren herzlichen Dank für die Überlassung der ätherischen Öle aus.

Literatur

- AFNOR NF T 72-281 Procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne. AFNOR. Paris, 1986.
- Bardana EJ, Anthony MJ. Indoor air pollution and health. Clinical allergy and immunology, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data New York, Basel, Hong Kong, 1996.
- Baudoux D. Antiviral and Antimicrobial properties of essential oils. 2000.
- Belaiche, P. L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M.S.A. Editeur. Paris. tome 1, 1979.
- Bluyssen PM, Cox C, et al. Why, when and how do HVAC-systems pollute the indoor environment and what to do about it? The European AIRLESS project. Building and Environment 2002;38:209–25.
- Burge HA, editor. Bioaerosols. Indoor Air Research Series. Lewis Publisher; 1995.
- Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*. JAppl Bacteriol 1995;78:264–9.
- CEN. Norme EN 1040 - Antiseptiques et désinfectants chimiques - Activité bactéricide de base - Méthode d'essai et prescriptions (phase 1). CEN et AFNOR. Brussel et Paris, 1997.
- Cox SD, Mann CM, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J Appl Microbiol 2000;88:170–5.
- de Billerbeck G. Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l'*aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, 2000.
- Dusart G. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. 17^{èmes} Journées Internationales des Huiles Essentielles et Extraits, Digne les Bains, Rivista Italiana EPPOS, 1998.
- Fleurette JJ. Freney, et al. Antiseptie et désinfection. Editions ESKA Paris, 1995.
- Flückiger B. Beurteilung der mikrobiellen Exposition in Wohnungen und Lüftungsanlagen. Naturwissenschaft, Eidgenössischen Technischen Hochschule 1999;117.
- Franchomme PD, Péroël D. (1990). Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. L'aromathérapie exactement. Limoges, 1990.
- Helander IM, Alakomi H, et al. Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. J Agric Food Chem 1998;46:3590–5.
- Hermal C. Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, 1993.
- Inouye S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). Int J Aromatherapy 2003;13:95–107.
- Inouye S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 2). Int J Aromatherapy 2003;13:173–84.
- Kunle O, Okogun J, et al. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. Phytomedicine 2003;10:59–61.
- Lambert RJW, Skandamis PN, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol 2001;91:453–62.
- Pibiri M-C. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Faculté Environnement Naturel et Construit, Ecole Polytechnique Fédérale, 2005.

Schnaubelt K. *Advanced aromatherapy, the science of essential oil therapy*. Vermont: Healing Arts Press, Inner Traditions International; 1998.

Walsh SE, Maillard J-Y, et al. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol* 2003;94:240-7.