

Ερευνητική εργασία

Αντιμικροβιακή δράση φυτικών αιθέριων ελαίων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών

Σταυρούλα Μαμούχα, Αναστασία Προμπονά

Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ,
Αγ. Παρασκευή, Αττική



Περίληψη

Η Ελλάδα φιλοξενεί τη μεγαλύτερη φυτική ποικιλότητα ανά μονάδα επιφάνειας στη γεωγραφική περιοχή της Μεσογειακής λεκάνης, η οποία περιλαμβάνεται στα «θερμά σημεία» βιοποικιλότητας του πλανήτη (Global Biodiversity Hot Spots). Είναι γνωστό ότι στην Ελλάδα φύονται 6.600 είδη και υποείδη αγγειόσπερμων από τα οποία 500-600 χαρακτηρίζονται ως αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά (Α.Φ.Φ.). Η εντατική έρευνα και βιοτεχνολογική αξιοποίηση των Α.Φ.Φ. οδήγησε τα τελευταία χρόνια σε ανάπτυξη του πρωτογενούς αγροτικού τομέα και στη δημιουργία νέων, σύγχρονων μονάδων καλλιέργειας. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν αιθέρια έλαια Α.Φ.Φ. τα οποία εξετάστηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση. Ο σκοπός της έρευνας είναι η επιλογή φυτικών εκχυλισμάτων ή/και αιθερίων ελαίων με αντιμικροβιακή δράση, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως φυσικά συντηρητικά σε προϊόντα κοσμετολογίας φυτικής προέλευσης. Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν φυτικά αιθέρια έλαια και τέσσερα πρότυπα βακτηριακά στελέχη, τρία Gram-θετικά (*Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Bacillus subtilis*

ATCC9372, *Micrococcus luteus* ATCC934) και ένα Gram-αρνητικό (*Escherichia coli* ATCC25922). Εφαρμόστηκε η μέθοδος Διάχυσης δίσκων Αντιμικροβιακής ουσίας σε Άγαρ (Disk Diffusion Assay). Τα πιο δραστικά αιθέρια έλαια ήταν από τα είδη του γένους *Citrus*. Σημαντικότερη ήταν η αναστολή ανάπτυξης των Gram-θετικών μικροοργανισμών.



Λέξεις κλειδιά

αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά, αιθέρια έλαια, αντιμικροβιακή δράση

Υπεύθυνη αλληλογραφίας

Σταυρούλα Μαμούχα

Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών,
Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών
ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

15341 Αγ. Παρασκευή, Αττική

Τηλ.: +306932476042, Fax: 210-6511767

E-mail: smamouha@yahoo.com

1. Εισαγωγή

1.1 Ελληνική φυτική βιοποικιλότητα - Αρωματικά, φαρμακευτικά φυτά

Η Μεσογειακή λεκάνη περιλαμβάνεται στα «θερμά σημεία» βιοποικιλότητας του πλανήτη (Global Biodiversity Hot Spots, όπου η Ελλάδα διαθέτει τη μεγαλύτερη φυτική ποικιλότητα ανά μονάδα επιφάνειας.¹ Συγκεκριμένα, 6.000 φυτικά είδη αναπτύσσονται στην χώρα μας, από τα οποία 500-600 ανήκουν στην ομάδα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.² Ένα ακόμη στοιχείο που κάνει την ελληνική χλωρίδα ιδιαίτερη, είναι το πολύ υψηλό ποσοστό ενδημισμού φυτικών ειδών, της τάξης του 15,6%, με 56 οικογένειες και 242 γένη.³ Το γεγονός αυτό αιτιολογείται από την τοπογραφία, το κλίμα και το γεωλογικό υπόβαθρο της Ελλάδας. Μεγάλο πλεονέκτημα είναι η έντονη διαφοροποίηση κλιματικών συνθηκών, από την Κρήτη μέχρι τα βόρεια σύνορα της χώρας και υψηλός αριθμός νησιών και βραχονησίδων, σχεδόν 19% της εδαφικής έκτασης. Το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί σε τουλάχιστον 3.000 νησιά και βραχονησίδες.⁴

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτικά είδη (Α.Φ.Φ.) αποτελούν αναντίρρητα σημαντικό μέρος της ελληνικής βιοποικιλότητας, καθώς οι εδαφολογικές και κλιματικές συνθήκες της χώρας μας ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξή τους. Η συνεχώς αυξανόμενη εμπορική ζήτηση των Α.Φ.Φ. οδήγησε στην ανάπτυξη νέων καλλιεργητικών μονάδων και στον εκσυγχρονισμό των παλαιότερων. Μεγάλες θερμοκηπιακές καλλιέργειες, αλλά και μικρές αγροτικές εκτάσεις, επιλέ-

γουν την αξιοποίηση Α.Φ.Φ. με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η ανάπτυξη αυτού του κλάδου της γεωργίας οφείλεται στην εύκολη και σχετικά οικονομική καλλιέργειά τους, καθώς τα Α.Φ.Φ. προσβάλλονται δύσκολα από φυτοπαθογόνα βακτήρια, έχοντας έτσι μειωμένες απαιτήσεις σε φυτοφάρμακα. Πρόσφατα ξεκίνησαν οργανωμένες καλλιέργειες σε περιοχές της Στερεάς Ελλάδας, της Θεσσαλίας, της Κεντρικής Μακεδονίας και της Θράκης για την αξιοποίηση της ρίγανης, μέντας, μελισσόχορτου, βασιλικού, λεβάντας, δενδρολίβανου, τσαγιού του βουνού, εχινάκειας και άλλων φυτών.

Τα Α.Φ.Φ. παρουσιάζουν αξιόλογες δυνατότητες οικονομικής εκμετάλλευσης διότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως ξηρό ή νωπό φυτικό υλικό, είτε ως παραλαμβανόμενο αιθέριο έλαιο. Ο φυτικός ιστός έχει πολλαπλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές και χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων, στον τομέα Φαρμακογνωσίας και Αισθητικής Κοσμετολογίας.

1.2 Αντιμικροβιακή δράση φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών

Τα Α.Φ.Φ. ταξινομούνται σε περίπου πενήντα οικογένειες (Abietaceae, Apiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Labiatae, Rutaceae, Iridaceae, Rosaceae κλπ.). Η αντιμικροβιακή δράση, άλλα και όλες οι βιολογικές ιδιότητες των φυτικών αυτών ειδών (αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, εντομοαπωθητική κ.τ.λ.) οφείλονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Με τον όρο δευτερογενείς μεταβολίτες, εννοούνται οι ενώσεις εκείνες οι οποίες, παρόλο που δε σχετί-

ζονται άμεσα με την ανάπτυξη ενός οργανισμού, συμβάλλουν στην επιβίωσή του.⁵

Τα βιοενεργά μόρια των Α.Φ.Φ. που ανήκουν στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών είναι τερπένια, φαινόλες και αλκαλοειδή. Οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς και προκαλούν αναστολή ή περιορισμό της ανάπτυξής τους. Οι αντιμικροβιακοί μηχανισμοί δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών αφορούν την τροποποίηση της μορφολογίας του μικροοργανισμού, την αναστολή της κυτταρικής αναπνοής, τη μείωση της συγκέντρωσης της ενδοκυτταρικής τριφωσφορικής αδενοσίνης, την παρεμπόδιση της δράσης των αντλιών αποβολής (efflux pumps) αντιβιοτικών και την αναστολή της βιοσύνθεσης απαραίτητων μικροβιακών ενζύμων ή νουκλεϊκών οξέων.⁶ Είναι πιθανό η αντιμικροβιακή δράση να μην οφείλεται σε μόνο μια ένωση, αλλά να υπάρχει συνέργεια μεταξύ πολλών ενώσεων, όπως και να συνυπάρχουν περισσότεροι μηχανισμοί δράσης.⁷

Μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι λειτουργικές υδροξυλομάδες και οι διπλοί δεσμοί των δευτερογενών μεταβολιτών εμπλέκονται στη σύνδεσή τους με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος ή της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών.⁸ Συνεπώς, η χημική δομή των φλαβονολών τις καθιστά πιο αποτελεσματικά μόρια, συγκριτικά με τις φλαβανόνες και φλαβανόλες, λόγω της ύπαρξης του 3',4',5'-τριυδροξυ β δακτυλίου και της ελεύθερης 3-υδροξυλομάδας.⁷ Η αντιμικροβιακή δράση των ταννινών οφείλεται στο σχηματισμό σύμπλοκων ενώσεων με τις πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, μεταβάλλοντας έτσι σημαντικές λειτουργίες των μικροοργανισμών.^{9,10}

Η παρουσία βιοενεργών μορίων σε ένα φυτικό εκ-

χύλισμα ή αιθέριο έλαιο, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Ενδεικτικά αναφέρονται ο τρόπος εκχύλισης (υδροαπόσταξη, εκχύλιση με μικροκύματα κ.τ.λ.), ο διαλύτης εκχύλισης, η συγκέντρωση της βιοδραστικής ουσίας στο εκχύλισμα, το μέρος του φυτικού οργανισμού (φύλλα, βλαστός, ρίζα, γαλακτώδης χυμός κ.ά.), το μικροβιακό στέλεχος το οποίο χρησιμοποιείται στις βιοδοκιμές, καθώς και η χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανίχνευσης βιοενεργών μορίων.¹¹

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθερίων ελαίων ελληνικών φυτών έναντι προτύπων στελεχών βακτηρίων. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα εξεταζόμενα έλαια χρησιμοποιούνται ήδη ως φυσικά συντηρητικά συστήματα από την μη κερδοσκοπική εταιρία Mellifora (εικόνα 1). Η προσθήκη τους στην παρασκευή φυσικών προϊόντων κοσμητολογίας στηρίζεται σε παραδοσιακές συνταγές και εμπειρικές παρατηρήσεις από το προσωπικό της εταιρίας. Τα έλαια, στα οποία θα ανιχνευθούν βιοενεργά μόρια, θα αποτελέσουν αντικείμενο μελέτης νέων ερευνών, ώστε να αξιοποιηθούν περαιτέρω από την εταιρία για την παρασκευή προϊόντων με βιοενεργό δράση εναντίον της ακμής. Με αυτόν τον τρόπο, αυξάνεται η εμπορική ζήτηση Α.Φ.Φ. και συνεπώς, ενισχύεται ο πρωτογενής τομέας της γεωργίας με νέες καλλιεργητικές μονάδες των αντίστοιχων φυτών.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Φυτικά είδη

Τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στα εξής φυτικά είδη: κέδρος (*Juniperus* sp., οικογένεια



Εικόνα 1

Αιθέρια έλαια από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά.

Cupressaceae), δάφνη (*Laurus nobilis*, οικογένεια Lamiales), περγαμόντο (*Citrus aurantium ssp bergamia*, οικογένεια Rutaceae), νεράντζι (*Citrus aurantium*, οικογένεια Rutaceae), φασκόμηλο (*Salvia officinalis*, οικογένεια Lamiales), γαρύφαλλο (*Dianthus caryophyllus*, οικογένεια Caryophyllaceae), πεύκο (*Pinus sp*, οικογένεια Pinaceae) και χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*, οικογένεια Compositae).

2.2 Βακτηριακά στελέχη (μικροοργανισμοί-δείκτες)

Για τον έλεγχο αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα στελέχη μικροοργανισμών από την Τράπεζα Στελεχών American Type Culture Collection (ATCC). Χρησιμοποιήθηκαν τρία Gram-θετικά (*Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Bacillus subtilis* ATCC9372, *Micrococcus luteus* ATCC9341) και ένα Gram-αρνητικό βακτήριο (*Escherichia coli* ATCC25922).

2.3 Βιοδοκιμές αντιβακτηριακής δράσης αιθερίων ελαίων: Διάχυση βιοενεργούς ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Το εναιώρημα με το μικροοργανισμό ετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).¹² Από το εναιώρημα επιστρώθηκαν, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton 500 μL με τη βοήθεια βαμβακοφόρου συτλεού (σε τρεις διαφορετικές κάθετες διευθύνσεις προκειμένου να επιτευχθεί ομοιόμορφη ανάπτυξη του μικροοργανισμού). Με αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετήθηκαν αποστειρωμένα, κυκλικά τεμαχίδια διηθητικού χαρτιού Whatman (δισκία διαμέτρου 6 mm). Στη συνέχεια, τα δισκία εμποτίστηκαν με 8 μL από το εκάστοτε φυτικό εκχύλισμα.⁵ Τα τρυβλία επώαστηκαν σε κλίβανο 37°C, για 24 ώρες και ακολούθησε έλεγχος αναστολής ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής μετρήθηκε σε mm. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δισκίο αντιβιοτικού εμπορίου (Gentamicin, 10 μg/δισκίο) και ως αρνητικός, ο διαλύτης εκχύλισης (νερό). Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.

2.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των τριών επαναλήψεων καταγράφηκαν σε συγκεντρωτικούς πίνακες στο πρόγραμμα Excel. Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων ζωνών αναστολής ανάπτυξης από τα τρία πειράματα.

3. Αποτελέσματα

Η δράση των βιοδραστικών ουσιών προσδιορίστηκε ποιοτικά, μετρώντας τη διάμετρο της ζώνης αναστο-

λής ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1 και στις ενότητες 2 και 3.

Το αιθέριο έλαιο του κέδρου (*Juniperus sp.*) προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης μόνο των Gram-θετικών βακτηρίων. Αναλυτικότερα, για το *B. subtilis* η διάμετρος της ζώνης αναστολής ήταν για το *S. aureus* 1,25 mm, ενώ για το *M. luteus* 3,13 mm.

Το αιθέριο έλαιο του γαρύφαλλου (*D. caryophyllus*) ήταν δραστικό και για το Gram-αρνητικό βακτήριο *E. coli*, με διάμετρο ζώνης αναστολής 1,00 mm. Για τα *B. subtilis*, *S. aureus* και *M. luteus* οι διαμέτροι ήταν αντίστοιχα 1,80, 1,10 και 2,97 mm.

Τα δύο φυτικά είδη της οικογένειας Rutaceae (*C. aurantium ssp. bergamia* και *C. aurantium*) παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης και των τεσσάρων μικροοργανισμών-δεικτών με παρόμοιες ζώνες αναστολής ανάπτυξης. Αναλυτικότερα, οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής παρατηρήθηκαν στο *M. luteus* (για το περγαμόντο και το νεράντζι ήταν 3,20 και 3,00 mm αντίστοιχα). Η διάμετρος της ζώνης αναστολής στο στέλεχος *E. coli* ήταν 1,15 mm (και για τα δύο αιθέρια έλαια). Ωστόσο, διαφορετικές ζώνες αναστολής παρατηρήθηκαν για το βακτήριο *B. subtilis*. Το περγαμόντο δημιούργησε διάμετρο αναστολής 1,3 mm, ενώ το νεράντζι 2,00 mm.

Από τα είδη της οικογένειας Lamiales, το αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου (*S. officinalis*) προκάλεσε μεγαλύτερες ζώνες αναστολής ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Η μεγαλύτερη παρατηρήθηκε στο *M. luteus* (3,62 mm), ενώ οι διαμέτροι των ζωνών αναστολής για τα *B. subtilis* και *S. aureus* ήταν 1,65 και 1,20 mm αντίστοιχα. Το αιθέριο έλαιο της δάφνης (*L. nobilis*) δεν προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης του *S. aureus*, ενώ η διάμετρος της ζώνης αναστολής στο *B. subtilis* ήταν 0,75 mm. Η αναστολή ανάπτυξης του στελέχους *E. coli* ήταν 1,00 mm.

Το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού (*M. chamomilla*) προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης μόνο των *M. luteus* (3,21 mm) και *B. subtilis* (0,63 mm) ενώ του πεύκου (*Pinus sp.*) τριών μικροοργανισμών-δεικτών, με μεγαλύτερη διάμετρο ζώνης αναστολής στο *M. luteus* (3,83 mm).

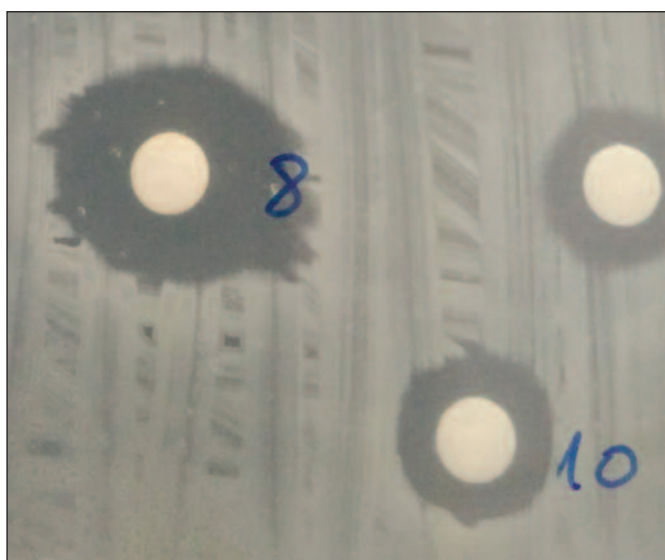
4. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, κυρίως στις οικονομικά ανεπτυγμένες χώρες, διαπιστώνεται μια συνεχής αύξηση στη ζήτηση προϊόντων με συστατικά φυτικής προέλευσης, κυρίως στα προϊόντα κοσμετολογίας. Για τον λόγο αυτό, πολλές αγροτικές μονάδες επενδύουν στις καλλιέργειες των Α.Φ.Φ. Ορισμένες από αυτές διαθέτουν και χώρους αποξήρανσης φυτικού ιστού, εκχυλίσεων, αποστάξεων και συσκευασίας. Το εμπορικό ενδιαφέ-

Πίνακας 1

Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων. Παρουσιάζεται η διάμετρος της ζώνης αναστολής των μικροοργανισμών-δεικτών (mm) (μέσος όρος και τυπική απόκλιση)

Διάμετρος ζώνης αναστολής ανάπτυξης						
Κοινή ονομασία	Λατινικό όνομα	Οικογένεια	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC9372	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922
Κέδρος	<i>Juniperus</i> sp	Cupressaceae	1,25±0,2	3,13±0,1	3,13±0,3	0,00
Γαρύφαλλο	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Caryophyllaceae	1,80±0,3	1,10±0,3	2,97±0,4	1,00±0,2
Δάφνη	<i>Laurus nobilis</i>	Lamiaceae	0,75±0,1	0,00±0,2	2,58±0,3	1,00±0,1
Φασκόμηλο	<i>Salvia officinalis</i>		1,65±0,3	1,20±0,2	3,62±0,8	0,00
Πεύκο	<i>Pinus</i> sp	Pinaceae	1,50±0,2	1,00±0,2	3,83±0,8	0,00
Νεράντζι	<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	2,00±0,2	2,00±0,2	3,00±0,9	1,15±0,2
Περγαμόντο	<i>Citrus aurantium</i> ssp <i>bergamia</i>		1,30±0,1	1,30±0,1	3,20±0,9	1,15±0,2
Χαμομήλι	<i>Matricaria chamomilla</i>	Asteraceae	0,63±0,4	0,00	3,21±0,8	0,00



Εικόνα 2

Αντιμικροβιακή δράση αιθέριων ελαίων έναντι προτύπου μικροοργανισμού. Παρουσιάζονται ενδεικτικά ζώνες αναστολής έναντι του *S. aureus*.

ρον των Α.Φ.Φ. εστιάζεται κυρίως στα αιθέρια έλαια.

Τα αιθέρια έλαια είναι παράγωγα τερπενίων, ουσιών δηλαδή του δευτερογενούς μεταβολισμού. Η σύσταση ενός αιθέριου ελαίου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η αβιοτική καταπόνηση (ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίες, διάρκεια φωτοπεριόδου), το μικροκλίμα της περιοχής, το μέρος του φυτικού οργανισμού

(φύλλα, καρπός, ρίζα), ο τρόπος εκχύλισης (υδροαπόσταξη, μικροκύματα) μπορούν να τροποποιήσουν την σχετική αφθονία ορισμένων χημικών ενώσεων ενός αιθέριου ελαίου. Για αυτό τον λόγο παρατηρούνται και αποκλίσεις στις συγκριτικές μελέτες χρωματογραφικών αναλύσεων ίδιων φυτικών ειδών τα οποία όμως αναπτύσσονται σε διαφορετική περιοχή.¹³

Όλα σχεδόν τα εδώ εξεταζόμενα αιθέρια έλαια, προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών. Η αντιμικροβιακή αυτή δράση, οφείλεται σε βιοενεργά μόρια που ανιχνεύονται στο μεταβολικό προφίλ του εκάστοτε φυτού.

Αναλυτικότερα, στο αιθέριο έλαιο της δάφνης έχουν προσδιοριστεί είκοσι εννέα κύριοι μεταβολίτες: 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη), λιναλόλη, σαβινένιο, ευγενόλη, πινένιο, λιμονένιο κ.ά.¹⁴ Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1, παρατηρήθηκε μεγάλη ζώνη αναστολής στο *M. luteus* (2,58 mm), ενώ για τα *S. aureus* και *E. coli*, οι αντίστοιχες ζώνες ήταν μικρότερες. Η μειωμένη ευαισθησία στα δύο αυτά βακτήρια παρατηρήθηκε και από τους Bennadja και συνεργάτες.¹⁵ Ενδιαφέρον είναι ότι σύμφωνα με άλλες μελέτες, έχει παρατηρηθεί αναστολή ανάπτυξης και βακτηρίων του γένους *Mycobacterium*.¹⁶

Στο αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου, τα κυριότερα πτητικά συστατικά τα οποία ανιχνεύονται με την αέρια χρωματογραφία είναι η καρβακρόλη, θυμόλη, καμφορά, η *cis*-θουγιένη και η ευκαλυπτόλη (1,8-κινεόλη).¹⁷ Η θουγιένη είναι ένας μεταβολίτης ο οποίος εντοπίζεται και στο φύλλα φυτών του γένους *Thuja*,¹⁸ ενώ η ευκαλυπτόλη στον ευκάλυπτο.¹⁹ Οι βιοδοκιμές με το αιθέριο έλαιο του φυτού προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης μόνο των Gram-θετικών βακτηρίων (1,65-4,62 mm). Η διάμετρος της ζώνης αναστολής στο στέλεχος *M. luteus* ήταν η μεγαλύτερη (4,62 mm) από όλα τα υπόλοιπα εξεταζόμενα αιθέρια έλαια. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι σε συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα των Dragana και συνεργατών.²⁰ Αντιμικροβιακή δράση έχει αναφερθεί και σε πιο πρόσφατες μελέτες.²¹

Στο αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού απαντούν κυρίως τερπένια όπως η βισαβολόλη και τα οξειδιά της, β-φαρνεσένιο, α-βισαβολόλη (κύριο συστατικό του ελαίου) και σε μικρότερες αναλογίες τα φαρνεσένιο, σπιροαιθέρας, θυμόλη, δεϋδρο-σεσκισινεόλη, σπαθουλενόλη και π-κυμένιο.²² Από την ομάδα των τερπενειδών ανιχνεύεται το χαμαζουλένιο, των φαινολικών οξέων, το φερουλικό οξύ και από τα φλαβανοειδή, η απιγενίνη.²³ Βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζουν

την αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου του είδους.²⁴ Στην παρούσα εργασία, το αιθέριο έλαιο του χαμομηλιού, ήταν δραστικό για το *M. luteus*, ενώ δεν προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης του *S. aureus*. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Mekonnen και συνεργατών.²⁵

Τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου του γαρυφάλλου ανήκουν κυρίως σε παράγωγα τερπενίων και λιπαρών οξέων. Αναλυτικότερα, στην αέρια χρωματογραφική ανάλυση έχει ανιχνευτεί σε μεγαλύτερη αφθονία τα β-καρβοφυλλένιο, β-οκυμένιο και η ευγενόλη.²⁶ Το αιθέριο έλαιο του φυτικού αυτού είδος προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης και στους τέσσερις μικροοργανισμούς δείκτες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία και με άλλες αντίστοιχες μελέτες.^{26,27}

Από το γένος *Citrus*, εξετάστηκαν τα αιθέρια έλαια των ειδών *Citrus aurantium* και *Citrus aurantium* ssp *bergamia*. Αέριες χρωματογραφικές μελέτες του μεταβολικού προφίλ, υπέργειου τμήματος, ειδών γένους *Citrus* αναφέρουν την παρουσία των εξής δευτερογενών μεταβολιτών: λιναλόλη, λιμονένιο, α- και β-πινένιο, τερπινεόλη, καρβεόλη, γερανιόλη, καρβεόνη καθώς και παράγωγά τους.^{28,29} Οι διάμετροι ζωνών αναστολής από τα δύο αυτά αιθέρια έλαια ήταν παρόμοιες, πιθανά λόγω της φυλογενετικής συγγένειας μεταξύ των ειδών. Η αντιμικροβιακή δράση αιθερίων ελαίων του γένους *Citrus* έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές.³⁰⁻³²

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν ότι τα εξεταζόμενα αιθέρια έλαια έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των προτύπων μικροοργανισμών. Τα αιθέρια έλαια τα οποία προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης όλων των μικροοργανισμών-δεικτών θα εξεταστούν περαιτέρω και θα προσδιοριστεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση καθώς και η αντιμικροβιακή τους δράση έναντι μυκήτων.

Ευχαριστίες

Οι συγγραφείς θα ήθελαν να ευχαριστήσουν την Μ.Κ.Ο. "Mellifera" για την χρηματοδότηση της έρευνας και την παραχώρηση των αιθερίων ελαίων.



Summary

Antimicrobial activity of essential oils from aromatic and medicinal plants

Stavroula Mamoucha, Anastasia Prombona

Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research DEMOKRITOS, Ag. Paraskevi, Attiki

Greece hosts the largest plant biodiversity per unit of area basis among the countries of the Mediterranean Basin, which is one of the Global Biodiversity Hot Spots. From the 6.600 endemic species and sub-species of angiosperms, 500-600 are characterized as aromatic and medicinal plants (A.M.P). In the recent years, there is an increasing interest for natural pharmaceutical and cosmetic products, based on A.M.P. constituents. This led to the extended cultivation of medicinal plants on new farming areas. The goal of this investigation is the utilization of plants' extracts with antimicrobial activity as natural preservatives in cosmetics. Plants' essential oils and standard bacterial strains were used: three Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Bacillus subtilis* ATCC9372, *Micrococcus luteus* ATCC934) and one Gram-negative bacterium (*Escherichia coli* ATCC25922). Bioactivity tests were performed by Disk Diffusion Assay. Essential oils from *Citrus* species were the most active and exhibited greater growth inhibition activity against Gram-positive than Gram-negative bacteria.



Λέξεις κλειδιά

antimicrobial assays, aromatic and medicinal plants, essential oils

Βιβλιογραφία

1. De Montmollin B, Strahm W, eds. 2005. The top 50 Mediterranean island plants. Wild plants at the brink of extinction, and what is needed to save them. Gland: IUCN.
2. Παπαναγιώτου Ε. και Παπανικολάου Κ. 2004. Αρωματικά φυτά: Προοπτικές καλλιέργειας στην περιοχή. Ημερίδα του Εμπορικού και Βιομηχανικού Επιμελητηρίου Κοζάνης, Αιανή 26-6-2004.
3. Georghiou K, Delipetrou P. Patterns and traits of the endemic plants of Greece. *Bot J Linn Soc* 2010; 162: 130–422.
4. Maloupa E, Krigas N, Grigoriadou K, Lazari D, Tsoktouridis G. Conservation strategies for native plant species and their sustainable exploitation: Case of the Balkan Botanic Garden of Kroussia, N. Greece. In: Teixeira da Silva JA, editor. Floriculture ornamental plant biotechnology: Advances and topical issues, 2008. Vol. V (4). Isleworth: Global Science Books. pp. 37–56.
5. Μαμούχα Σ, Καντεράκης Γ, Μπουτσικάκη Ι, Σαββίδης ΑΛ, Καραγκούνη-Κύρτσου Α. Μέθοδοι Ελέγχου Παραγωγής Βιοδραστικών Ουσιών: Γένη βακτηρίων με



- βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. *Αρχαϊκή Ιατρ.* 2014; 33:22-30.
6. Phillips MC. Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol. *Efflux J Biol Chem.* 2014; 289: 24020-9.
 7. Wink M. Biochemistry, Physiology and Ecological Function of Secondary Metabolites. *Ann Plant Revs* 2010; 40: 1-19.
 8. Dzoyem JP, Hamamoto H, Ngameni B, Ngadjui BT, Sekimizu K. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. *Drug Discov Ther.* 2013;7 :66-72.
 9. Omojate GC, Enwa FO, Jewo AO, Eze CO. Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals against Enteric Pathogens – A Review. *J Pharmac, Chem Biol Sci* 2014; 2:77-85.
 10. Engels C, Schieber A, Gänzle MG. Inhibitory Spectra and Modes of Antimicrobial Action of Gallotannins from Mango Kernels (*Mangifera indica* L.) *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77: 2215-2223.
 11. Sasidhara S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga L. Latha Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011; 8: 1–10.
 12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th ed. Approved standard M2-A8. 2003. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 13. Sampaio BL, Edrada-Ebel RA, Da Costa FB. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Sci Rep* 2016; 6: 29265.
 14. Sahin Basak S, Candan F. Effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and its main components on α -glucosidase and reactive oxygen species scavenging activity. *Iranian J Pharmac Res* 2013; 12:367-379.
 15. Bennadja S, 2, Tlili Ait Kaki Y, Djahoudi A, Hadeif Y, Chefrour A. Antibiotic Activity of the Essential Oil of Laurel (*Laurus nobilis* L.) on Eight Bacterial Strains *J Life Sci* 2013; 7: 814-819.
 16. Flores CR, Pennec A, Nugier-Chauvin C, Daniellou R, Herrera-Estrella L, Chauvin AL. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils extracted from plants cultivated in Mexico. *J Mex Chem Soc* 2014; 58: 452–455.
 17. Baj T, Ludwiczuk A, Sieniawska E, Skalicka-Woźniak K, Widelski J, Zieba K, Główniak K. GC-MS analysis of essential oils from *Salvia officinalis* L.: comparison of extraction methods of the volatile components *Acta Pol Pharm* 2013; 70:35-40.
 18. Naser B, Bodinet C, Tegtmeier M, Lindequist U. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A Review of its Pharmaceutical, Pharmacological and Clinical Properties. *Evid-based Compl Alt Med* 2005; 2:69-78.
 19. Song A, Wang Y, Liu Y. Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* Labill from China. *Asian J Tradit Med* 2009; 4: 134-140.
 20. Dragana MĆ, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J, Stanković S, Draga S. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.) *Arch Biol Sci* 57 2005; 3: 173-178.
 21. Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I et al. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Ecol Health Dis* 2015; 26.
 22. Lopez M, Blazquez M. A Characterization of the essential oils from commercial chamomile flowers and chamomile teabags by GC-MS Analysis. *Inter J Pharmac Phytoch Res* 2016; 8: 1487-1491.
 23. Stanojević L, Stanković M, Nikolić V, Nikolić L, Ristić D, Canadanovic-Brunet J, Tumbas V. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors (Basel)*. 2009; 9:5702-14..
 24. Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 67: 187–195.
 25. Mekonnen A, Berhanu Y, Alemnesh T, Taddese S. Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperii*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis* *Inter J Microb* 2016; ID 9545693.
 26. Abdelkader HS, Halawani EN. GC-MS analysis and antimicrobial activity of *Dianthus caryophyllus* extracts from Taif, Saudi Arabia. *Inter J Pharm BioSci* 2014; 5: P389-P401.
 27. Golestani MR, Rad M, Bassami M, Afkhami-Goli A. Analysis and evaluation of antibacterial effects of new herbal formulas, AP-001 and AP-002, against *Escherichia coli* O157:H7 *Life Sci* 2015; 15: 22-6.
 28. Abderrezak MK, Abaza I, Aburjai T, Kabouche A, Kabouche Z. Comparative compositions of essential oils of *Citrus aurantium* growing in different soils. *J Mater Environ Sci* 2014; 5: 1913-1918.
 29. Mondello L, Casilli A, Quinto PT, Costa R, Dugo P, Dugo G. Fast GC for the Analysis of *Citrus oils* *J Chromat Sci* 2004: 410-16.
 30. Oikeh EI, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi K. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Sci Nutr* 2016; 4:103-109.
 31. Pandey A, Kaushik A, Kumar ST. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Citrus limon*. *J Pharmac Biomed Sci* 2011; 13: 1-7.
 32. Gülay Kirbaşlar F, Aydin T, Başaran D, Gülen T. Antimicrobial activity of turkish *Citrus* peel oils *Pak J Bot* 2009; 41: 3207-3212.