

Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije

Nemanja S. Stanković¹, Ljiljana R. Čomić², Branislava D. Kocić³, Dejan M. Nikolić⁴,
Tatjana M. Mihajilov-Krstević⁵, Budimir S. Ilić⁶, Dragoljub L. Miladinović⁶

¹Odsek za sanitarnu mikrobiologiju, Institut javnog zdravlja, Niš, Srbija

²Odsek za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

³Odsek za mikrobiologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

⁴Odsek za sanitarnu hemiju, Institut javnog zdravlja, Niš, Srbija

⁵Odsek za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

⁶Odsek za farmaciju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

Izvod

U radu su prikazani rezultati proučavanja hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti etarskih ulja gajenih biljnih vrsta *Thymus vulgaris* L. (timus) i *Lavandula angustifolia* L. (lavanda) iz Srbije na pet vrsta bakterija, laboratorijskog kontrolnog soja i kliničkih izolata, s ciljem uspostavljanja i objašnjenja odnosa antibakterijska aktivnost–hemijski sastav. Hemijska analiza etarskih ulja je realizovana korišćenjem gasne hromatografije (GC) i gasne hromatografije/masene spektrometrije (GC/MS), dok je antibakterijska aktivnost određivana mikrodilucionom metodom. Dominantne komponente etarskog ulja timusa su timol (59,95%) i *p*-cimen (18,34%), dok su linalil acetat (38,23%) i linalol (35,01%) osnovne komponente etarskog ulja lavande. Utvrđeno je da oba etarska ulja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost na sve testirane bakterijske sojeve. Gram-pozitivne bakterije su znatno osetljivije na ulje timusa, dok etarsko ulje lavande ispoljava veću aktivnost na Gram-negativne bakterije. Poredeći baktericidne koncentracije etarskih ulja, utvrđene su niže vrednosti za *T. vulgaris* i više vrednosti za *L. angustifolia*.

Ključne reči: *Thymus vulgaris*; *Lavandula angustifolia*; antibakterijska aktivnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Sintetički antibiotici, penicilin, streptomycin i ostali, su od svog otkrića u dvadesetom veku, značajno uticali na smanjenje rizika od nastanka zaraznih bolesti. S druge strane poslednjih godina su bakterijske infekcije (infekcija respiratornog trakta, meningitis, polne bolesti) sve učestanije, uzrokovane pre svega rezistentnošću bakterija na sintetičke antibiotike [1]. Stoga je neophodno razviti prirodan i bezbedan način kontrole i zaštite ljudi i životinja od bakterijskih infekcija. Za veliki broj etarskih ulja se zna da poseduju antimikrobna svojstva i da je u mnogim slučajevima ova aktivnost posledica prisustva različitih klasa monoterpena [2]. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i njihovih komponenata može varirati od delimične do potpune inhibicije rasta bakterije, tako da etarska ulja ispoljavaju bakteriostatičku ili baktericidnu aktivnost [3].

Metode ispitivanja antimikrobne aktivnosti možemo podeliti na difuzione, dilucione i bioautografske metode [4]. Metodološki pristup i mogućnost primene navedenih metoda su objašnjeni u literaturi, ali se čini da

ipak ne postoji standardni test za procenu antibakterijske aktivnosti potencijalnih antimikrobnih agenasa [5]. Cilj ovog rada je bio da se utvrdi moguća veza između komponenata etarskog ulja i njihove antibakterijske aktivnosti. *Thymus vulgaris* i *Lavandula angustifolia* su izabrani radi poređenja antibakterijske aktivnosti dominantnih klasa jedinjenja etarskih ulja: oksidovanih monoterpena lavande i fenolnih jedinjenja timusa. Drugi razlog za proučavanje ovih biljnih vrsta je provera kontradiktornih literaturnih podataka o realnoj antibakterijskoj moći lavande, u poređenju sa dokazanom antibakterijskom aktivnošću etarskog ulja timusa.

EKSPERIMENTALNI DEO

Biljni materijal

Biljne vrste *T. vulgaris* i *L. angustifolia* sakupljene su u julu 2010. godine na oglednom polju Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr. Josif Pančić“, Pančevo, Srbija.

Izolovanje ulja

Sprašena droga podvrgnuta je procesu hidrodestilacije na *Clavenger* aparatu u trajanju od 3 sata. Izolovana etarska ulja su osušena anhidrovanim natrijum-sulfatom i čuvana na temperaturi od 4 °C.

Preписка: N.S. Stanković, Odsek za sanitarnu mikrobiologiju, Institut javnog zdravlja, Bulevar dr Zorana Đinđića 50, 18000 Niš, Srbija.

E-pošta: nemanjastankovic@hotmail.com

Rad primljen: 17. maj, 2011

Rad prihvaćen: 22. jul, 2011

NAUČNI RAD

UDK 547.913:58]:544:615.281

Hem. Ind. 65 (5) 583–589 (2011)

doi: 10.2298/HEMIND110517051S

Gasna hromatografija (GC)

GC analiza etarskog ulja je urađena na gasnom hromatografu HP-5890 Series II, opremljenim *split-splitless* injektorom, kapilarnom kolonom sa HP-5MS stacionarnom fazom (30 m×0,25 mm; debljina filma 0,25 μm), helijumom kao nosećim gasom (1 ml/min) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Temperatura injektora iznosila je 250 °C, detektora 280 °C, dok je temperatura kolone kontinualno povećavana od 50 do 250 °C (3 °C/min).

Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)

GC/MS analiza je urađena na Agilent Technologies aparatu, model GS 6890N, pri 70 eV, sa detektorom tipa MSD 5975C, pod istim gasno-hromatografskim uslovima.

Identifikacija komponenti

Identifikacija komponenti ulja vršena je masenospektrometrijski, poređenjem retencionih vremena i masenih spektara komponenti sa referentnim supstancama i/ili jedinjenjima iz raspoložive baze podataka (Wiley 275, NIST/NBS). Poređenje eksperimentalno dobivenih vrednosti Kovats index (I_k) primenom programa Amdis (verzija 2.64) sa literaturnim vrednostima [6], dodatno je potvrdilo tačnost analize.

Bakterijski sojevi

Antibakterijska aktivnost uzoraka etarskih ulja je ispitivana na 5 različitih bakterija: laboratorijskih tipskih sojeva iz *American Type Culture Collection* (ATCC) i kliničkih izolata iz patološkog materijala pacijenata sa različitim infekcijama, u mikrobiološkoj laboratoriji na Odseku sanitarne mikrobiologije, Instituta javnog zdravlja u Nišu, Srbija. Iz grupe Gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43895 i *Salmonella enteritidis* ATCC 9027. Iz grupe Gram-pozitivnih bakterija: *Bacillus cereus* ATCC 8739 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Od prekonocnih kultura bakterijskih sojeva pripremljene su suspenzije turbiditeta 0.5 McFarlanda (gustine 10^7 – 10^8 CFU/ml, zavisno od soja – propisano od strane Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2009 [7]).

Mikrodiluciona metoda

Upotrebom mikrodilucione metode određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija ispitivanih ulja (MBC) [7]. U smeši etanol–voda (70 vol.% etanola) napravljene su serije duplih razblaženja ispitivanih ulja i zatim je uneseno, u mikrotitar ploče sa 96 udubljenja, po 10 μl u 90 μl inokulisane tečne podloge (Mueller–Hinton bujon). Finalna zapremina u svakom udubljenju je bila 100 μl, finalna gustina bakterijskih ćelija 10^6 CFU/ml, a koncentracije ispitivanih ulja bile su u opsegu od 0,025 do 50,0 μl/ml. Mikrotitar ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Svi

eksperimenti su urađeni u tri ponavljanja. Korišćene su dve kontrole, hranljivi medijum sa rastvaračem etanolom (negativna kontrola) i antibiotik tetraciklin (pozitivna kontrola). Bakterijski rast je detektovan dodavanjem po 20 μl 0,5% vodenog rastvora trifeniltetrazolium-hlorida (TTC). MIC je definisana kao najniža koncentracija ispitivanih etarskih ulja pri kojoj nema vidljivog rasta bakterija, crveno obojenih kolonija na dnu udubljenja mikrotitar ploče nakon dodavanja TTC-a. Da bi se odredila MBC, sadržaj udubljenja u kojima nije bilo vidljivog rasta je prenešen na petri ploče sa Mueller–Hinton agarom (MHA) i inkubiran 24 h na 37 °C, nakon čega su brojane porasle kolonije. MBC je ona koncentracija pri kojoj je ubijeno 99,9% od početnog broja bakterijskih ćelija.

Statistička obrada podataka

Rezultati su statistički obrađeni analizom varijance (Anova) sa sigurnošću od 95% ($p \leq 0,05$), primenom programa Matlab.

REZULTATI I DISKUSIJA

Prinos etarskog ulja *L. angustifolia* iznosio je 3% (v/w). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja lavande, identifikovano je 26 komponentata, koje predstavljaju 99,60% ukupno detektovanih komponentata (tabela 1).

Prinos etarskog ulja *T. vulgaris* iznosio je 2,8% (v/w). Na osnovu GC i GC/MS analize etarskog ulja timusa, identifikovano je 7 komponentata, koje predstavljaju 100% ukupno detektovanih komponentata (tabela 1). Komponente etarskog ulja *T. vulgaris* možemo podeliti na četiri grupe: 1) ugljovodonični monoterpeni, 2) oksidovani monoterpeni, 3) ugljovodonični seskviterpeni i 4) fenolna jedinjenja. Fenolna jedinjenja predstavljaju dominantnu grupu jedinjenja etarskog ulja *T. vulgaris* (63,88%), sa timolom kao osnovnom komponentom (59,95%). Predstavnik ugljovodoničnih monoterpena ulja timusa je *p*-cimen (18,34%), dok je β -kariofilen (3,24%) jedini seskviterpen ovog ulja. Podaci u literaturi ukazuju da je sličan hemijski sastav etarskog ulja utvrđen za ovu biljnu vrstu iz Srbije [8]. Hemijskim ispitivanjima timusa u svetu potvrđeno je postojanje šest hemotipova: geraniol, linalol, γ -terpineol, karvakrol, timol i *trans*-tujon-4-ol/terpinen-4-ol. Dokazano je da genetska predispozicija i ekološki uslovi utiču na prinos i sastav etarskih ulja timusa [9].

Oksidovani monoterpeni predstavljaju dominantnu grupu etarskog ulja *L. angustifolia* (87,36%), sa linalolom (35,01%) i linalil-acetatom (38,23%) kao glavnim komponentama. Dominantna jedinjenja klase ugljovodoničnih monoterpena (5,49%) ulja lavande su: α -pinen, limonen, β -*trans*-ocimen i kamfen, dok je β -kariofilen glavni seskviterpen ovog ulja. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja etarskog

Tabela 1. Hemijski sastav etarskih ulja (%) *T. vulgaris* i *L. angustifolia*
 Table 1. Essential oil composition (%) of *T. vulgaris* and *L. angustifolia*

Komponenta	Retencino vreme, RT / min	I_K^a	<i>T. vulgaris</i>	<i>L. angustifolia</i>
Ugljovodonični monoterpeni	–	–	23,35	5,49
α -Pinen	8,408	948	–	1,41
Kamfen	8,960	968	–	0,59
β -Pinen	9,909	987	–	0,46
β -Miricen	10,323	995	–	0,68
<i>p</i> -Cimen	11,575	1015	18,34	–
Limonen	11,747	1023	–	1,07
β - <i>trans</i> -Ocimen	11,989	1037	–	0,84
β - <i>cis</i> -Ocimen	12,365	1043	–	0,44
γ -Terpinen	12,785	1056	5,01	–
Oksidovani monoterpeni	–	–	9,53	87,36
1,8-Cineol	11,853	1027	3,94	3,80
β -Linalol	14,320	1106	5,59	35,01
Kamfor	16,124	1137	–	3,99
Izoborneol	16,665	1149	–	0,37
Borneol	17,010	1163	–	2,84
4-Terpineol	17,281	1173	–	0,96
β -Fenčol	17,802	1201	–	0,44
Linalil-acetat	19,895	1256	–	38,23
Lavandulil-acetat	20,844	1278	–	0,62
<i>Cis</i> -geranil-acetat	23,343	1349	–	0,39
<i>Trans</i> -geranil-acetat	23,998	1363	–	0,71
Ugljovodonični seskviterpeni	–	–	3,24	4,97
β -Kariofilen	25,339	1414	3,24	4,30
(<i>E</i>)- β -Farnezen	26,366	1440	–	0,23
β -Selinen	26,477	1469	–	0,44
Oksidovani seskviterpeni	–	–	0	0,24
Kariofilen-oksidi	30,301	1561	–	0,24
Fenolna jedinjenja	–	–	63,88	0
Timol	21,108	1270	59,95	–
Karvakrol	21,350	1297	3,93	–
Ostalo	–	–	0	1,54
3-Oktanon	10,184	991	–	0,24
Heksil-acetat	11,140	1007	–	0,36
1-Okten-3-ol acetat	14,671	1111	–	0,25
Heksil ester butanske kiseline	17,657	1185	–	0,69
Ukupno	–	–	100,00	99,60

^aKovats indeks (eksperimentalno utvrđeni retencioni indeksi koiniciranjem sa homologom serijom n-alkana)

ulja lavande iz Srbije [8]. Za etarska ulja lavande iz Indije karakterističan je visok sadržaj limonena (11,0%), citranelola (10,0%) i α -terpineola (7,6%) kao i nizak sadržaj linalola (10%) [10]. Pokazano je da kvantitativan sastav etarskog ulja lavande zavisi od genotipa biljke i mesta uzgajanja dok se kvalitativan sastav menja značajno sa promenom nadmorske visine i mikroklimatskih faktora [11].

U tabeli 2 prikazani su rezultati antibakterijske aktivnosti ispitivanih etarskih ulja. Rezultati pokazuju izra-

ženu antibakterijsku aktivnost ulja na sve proučavane bakterijske sojeve. Etarska ulja timusa su pokazivala antimikrobnu aktivnost na sve testirane bakterije, sa MIC vrednostima u opsegu 0,025–0,10 μ l/ml i MBC vrednostima 0,05–0,78 μ l/ml. Vrednosti MIC etarskog ulja lavande su u intervalu 0,025–0,20 μ l/ml dok su MBC vrednosti u opsegu 0,05–0,78 μ l/ml. Inhibitorna aktivnost referentnog antibiotika tetraciklina je zabeležena u opsegu koncentracija 0,025–0,05 μ l/ml.

Tabela 2. Antimikrobna aktivnost ($\mu\text{l/ml}$) etarskih ulja *T. vulgaris* i *L. angustifolia*
 Table 2. Antimicrobial activity ($\mu\text{l/ml}$) of *T. vulgaris* and *L. angustifolia* essential oils

Bakterijski soj	<i>T. vulgaris</i>		<i>L. angustifolia</i>		Tetraciklin	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,025	0,780	0,025	0,050	0,025	0,025
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,050	0,780	0,100	0,390	0,025	0,025
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	0,025	0,025	0,050	0,200	0,025	0,025
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,100	0,390	0,100	0,390	0,025	0,025
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,050	0,100	0,100	0,200	0,025	0,025
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,050	0,050	0,200	0,780	0,025	0,025
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
<i>Bacillus cereus</i>	0,050	0,100	0,050	0,100	0,025	0,025
<i>Escherichia coli</i> ATCC 13706	0,100	0,390	0,100	0,780	0,100	0,100
<i>Escherichia coli</i> (iz urina)	0,100	0,390	0,100	0,780	0,025	0,025
<i>Escherichia coli</i> (iz fecesa)	0,025	0,050	0,025	0,050	0,025	0,025

Hidrofobnost je važna karakteristika etarskih ulja i njenih komponenata, koja povećava permeabilnost ćelijske membrane bakterije i omogućava lakši prolazak komponenata kroz njen lipidni sloj. Promena propustljivosti ćelijske membrane obično je praćena gubitkom osmotske kontrole ćelije, što se smatra osnovnim principom antibakterijskog delovanja etarskih ulja [12]. Zbog različite rastvorljivosti antimikrobnih komponenata u vodi, postoje brojne studije koje primenjuju različite metode ispitivanja antibakterijske aktivnosti [13]. Antimikrobna aktivnost se često određuje i disk difuzionom metodom, koja u potpunosti zavisi od rastvorljivosti komponenata u vodi i njihove difuzije kroz agar. Trebalo bi očekivati da jedinjenja niže rastvorljivosti u vodi ispoljavaju manju baktericidnu aktivnost ovom metodom, pri čemu bi ispitivane ugljovodonične komponente etarskog ulja plutale na površini medijuma ili isparile [3]. Za metodu mikrodilucije koja se izvodi na mikrotitarskim pločama, u poređenju sa disk difuzionom metodom je potrebna manja količina medijuma i etarskih ulja, pri čemu je izvođenje postupka znatno brže i efikasnije. Navedene činjenice su nas opredelile da mikrodiluciona metoda bude naša metoda izbora.

Mehanizam delovanja terpenoida se intenzivno proučava, ali još uvek u potpunosti nije objašnjena veza između njihove antibiotske aktivnosti i hemijske strukture. Mnoga hemijska jedinjenja u sastavu etarskih ulja reaguju sa proteinima ćelijske membrane. Dokazano je da ciklični ugljovodonici reaguju sa ATPazom, enzimom smeštenim na ćelijskoj membrani koji je okružen molekulima lipida. Takođe ugljovodonici mogu uticati na distorziju proteina u lipidnoj membrani što može dovesti do direktne interakcije lipofilne komponente sa hidrofobnim delom proteina [14]. Uglavnom fenoli i alkoholi ispoljavaju najjače inhibitorno dejstvo na rast bakterija, zatim slede aldehidi i ketoni, dok je inhibitorna aktivnost ugljovodoničnih monoterpena vrlo mala. Slobodna hidroksilna grupa alkohola i fenola može biti uzrok njihove

aktivnosti. Takođe je potvrđeno da terpenoidi imaju različitu antiseptičku moć, zavisno od njihove rastvorljivosti u vodi. Međutim uočene su i neke anomalije u vezi timola i karvakrola koji i pored slabe rastvorljivosti u vodi pokazuju izrazito antiseptičko dejstvo [3].

Rezultati naših ispitivanja ukazuju na snažan uticaj etarskog ulja timusa na Gram-pozitivne bakterije. Ova činjenica je posebno potvrđena na osnovu MBC vrednosti. Takođe je dokazano je da ne postoji značajna razlika u MIC i MBC vrednostima između laboratorijskog kontrolnog soja i kliničkih izolata, izuzev kod *P. aeruginosa* i *E. coli* (tabela 2). Ovaj zaključak je vrlo bitan jer ukazuje da na to da su klinički izolati, koji su rezistentniji u poređenju sa laboratorijskim sojevima, podjednako osetljivi na etarsko ulje timusa. Eksperimentalno utvrđene vrednosti MIC i MBC za sve testirane bakterije bile su niže u odnosu na literaturne podatke [8]. Za razliku od Gram-pozitivnih bakterija, Gram-negativne bakterije se odlikuju većom rezistentnošću prema antisepticima i dezinfekcionim sredstvima upravo zbog spoljašnje membrane koja deluje kao barijera za ulazak antibakterijskih agenasa [15].

Mehanizam delovanja timola, glavne komponente etarskog ulja timusa, i karvakrola zasniva se na povećanju permeabilnosti ćelijske membrane. Oba molekula su sposobna da razore spoljašnju membranu Gram-negativnih bakterija, oslobađajući lipopolisaharide i povećavajući propustljivost ćelijske membrane [5]. Studije sa bakterijom *B. cereus* su pokazale da karvakrol interaguje sa ćelijskom membranom, pri čemu se smešta u fosfolipidnom dvosloju između lanaca masnih kiselina [16]. Istraživanja su pokazala da biološki prekursor karvakrola, *p*-cimen, intenzivnije utiče na povećanje permeabilnosti ćelijske membrane i bubrenje ćelije za razliku od samog karvakrola [17].

Fungicidna aktivnost etarskog ulja lavande je naučno dokazana [18]. Određena istraživanja vezana za antibakterijsko delovanje etarskih ulja različitih vrsta roda

Lavandula (*L. angustifolia*, *L. allardii*, *L. heterophylla* i *L. stoechas*) sa velikom dozom uzdržanosti govore o njihovoj realnoj antibakterijskoj vrednosti. Ispitivana etarska ulja su ispoljavala veoma različitu antimikrobnu aktivnost, na veći broj testiranih bakterijskih sojeva. Krajnji zaključak ovih istraživanja je nemogućnost utvrđivanja jasne korelacije između antibakterijske aktivnosti etarskog ulja i sadržaja njegove glavne komponente [11].

Antimikrobna aktivnost etarskog ulja, može se potpuno razlikovati od aktivnost njenih pojedinačnih komponentata [19]. Utvrđeno je da inhibitorna aktivnost etarskih ulja, zavisi od složenih interakcija među njenim komponentama, što može imati aditivan, sinergistički ili antagonistički uticaj na antimikrobno dejstvo ulja [20]. Sibanda i saradnici su ispitivali antimikrobno dejstvo etarskog ulja lista *Heteropyxis dehniae* (sadrži 58,3% linalola kao glavne komponente) pri čemu su ustanovili više, niže ili slične aktivnosti u odnosu na čist linalol zavisno od vrste testiranog mikroorganizma [21]. Faleiro i saradnici su dokazali da bakterija *E. coli* koja je jako osetljiva na čist linalol, postaje jako rezistentna na smešu (1:1) linalola i 1,8-cineola [22]. Prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti linalola, karvakrola, perilaldehida i 1,8-cineola na mikrobe vazduha, zabeležena je izrazita antimikrobna aktivnost linalola koji je smanjio njihov broj za 29,7% [23]. Mahboobi i saradnici su u svom ispitivanju zaključili da etarska ulja karanfilića, lavande i geraniuma ispoljavaju snažno antibakterijsko delovanje na veoma rezistentan soj *P. aeruginosa* i ukazali na potencijalnu primenu testiranih ulja na jednu od najrezistentnijih Gram-negativnih bakterija [24]. S druge strane, ispitivanja Matasyoha i saradnika su ukazala na snažno antimikrobno dejstvo linalola ali i na njegov slab efekat na *P. aeruginosa* [25]. Ova vrsta bakterija je uzrok mnogih infekcija u organizmu koje dovode do pojave bakteremije i endokarditisa. Lečenje ove bakterije predstavlja ozbiljan problem u medicini zbog njene izuzetne otpornosti, uzrokovane strukturom spoljašnje membrane.

Rezultati naših istraživanja su potvrdili literaturne podatke o većoj osetljivosti Gram-negativnih bakterija na etarska ulja lavande [24]. Pokazano je da postoji razlika u MIC i MBC vrednostima između laboratorijskog kontrolnog soja i kliničkih izolata izuzev kod *B. cereus* ATCC 8739 (tabela 2). Eksperimentalno utvrđene vrednosti MIC i MBC za sve testirane bakterije bile su niže u odnosu na literaturne podatke [8]. Snažnu antibakterijsku aktivnost etarskog ulja lavande na Gram-negativne bakterije, posebno na *P. aeruginosa*, možemo objasniti sinergizmom različitih molekula sadržanih u etarskom ulju. Dokazano je da glavne komponente etarskih ulja prilično dobro reflektuju biofizičke i biološke karakteristike ulja i da intenzitet antimikrobnog delovanja ulja zavisi od koncentracija glavnih komponentata [27]. Ova konstatacija dovodi u pitanje validnost

teorije o sinergizmu više prisutnih komponentata. Međutim, utvrđeno je da se antimikrobna aktivnost glavnih komponentata etarskih ulja može menjati drugim, manje zastupljenim molekulima [28]. Uostalom, verovatnije je da nekoliko komponentata etarskog ulja određuju njegov miris, gustinu, boju a iznad svega penetraciju kroz ćeliju, fiksaciju za ćelijske zidove i membrane i distribuciju u ćeliji. Imajući u vidu iznete činjenice i koncept sinergističke aktivnosti, bitnije je proučavati etarsko ulje, nego njegove pojedinačne komponente [29].

ZAKLJUČAK

Postojanje brojnih komercijalnih antibiotika i prehrambenih aditiva za kontrolu infekcija i bolesti ljudi može dovesti do antibiotske rezistencije humanih patogenata. Stoga je neophodno razviti prirodan i bezbedan način za kontrolu infektivnih bolesti. Cilj ovog rada bio je hemijska i antibakterijska karakterizacija etarskih ulja *T. vulgaris* i *L. angustifolia* iz Srbije, sa naglaskom na odnos hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti ulja. Osnovne komponente etarskog ulja *T. vulgaris* su timol i *p*-cimen, dok su linalol i linalil-acetat predstavljali glavne komponente ulja *L. angustifolia*. Etarska ulja su pokazala antimikrobnu aktivnost prema svim ispitanim bakterijama. Dokazano je da su Gram-pozitivne bakterije znatno osetljive na etarsko ulje timusa dok je rast Gram-negativnih bakterija značajnije inhibiran etarskim uljem lavande. Relativno niske koncentracije ulja timusa i nešto više koncentracije ulja lavande pokazala su baktericidnu aktivnost. Na osnovu iznetog može se zaključiti da se etarska ulja timusa i lavande u niskim koncentracijama mogu koristiti za prevenciju i lečenje infektivnih bolesti životinja i ljudi izazvanih patogenim bakterijskim vrstama.

LITERATURA

- [1] A.D. Russell, Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations, *Lancet Infect. Dis.* **3** (2003) 794–803
- [2] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils – A review, *Food Chem. Toxicol.* **46** (2008) 446–475
- [3] S.G. Griffin, S.G. Wyllie, J.L. Markham, D.N. Leach, The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour Frag. J.* **14** (1999) 322–332
- [4] J.L. Rios, M.C. Recio, A. Villar, Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature, *J. Ethnopharmacol.* **23** (1988) 127–149
- [5] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review, *Int. J. Food Microbiol.* **94** (2004) 223–253

- [6] R.P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007
- [7] CLSI M07-A08, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2009
- [8] M. Soković, J. Glamočlija, P.D. Marin, D. Brkić, L.J. van Griensven, Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model, *Molecules* **15** (2010) 7532–7546
- [9] B. Imelouane, H. Amhamdi, J.P. Wathelet, M. Ankit, K. Khedid, A.E. Bachiri, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco, *Int. J. Agric. Biol.* **11** (2009) 205–208
- [10] R.S. Verma, L.U. Rahman, C.S. Chanotiy, R.K. Verma, A. Chauhan, A. Yadav, A. Singh, A.K. Yadav, Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India, *J. Serb. Chem. Soc.* **75** (2010) 343–348
- [11] H.M.A. Cavanagh, J.M. Wilkinson, Lavender essential oil: a review, *Aust. Infec. Control* **10** (2005) 35–37
- [12] J. Sikkema, J.A.M. De Bont, B. Poolman, Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 8022–8028
- [13] S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bell, J.E. Gustafson, J.R. Warmington, S.G. Wyllie, The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *J. Appl. Microbiol.* **88** (2000) 170–175
- [14] J. Sikkema, J.A. De Bont, B. Poolman, Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. Rev.* **59** (1995) 201–222
- [15] G. McDonnell, A. Denver-Russell, Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (1999) 147–179
- [16] A. Ultee, E.P.W. Kets, M. Alberda, F.A. Hoekstra, E.J. Smid, Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol, *Arch. Microbiol.* **174** (2000) 233–238
- [17] A. Ultee, M.H.J. Bennink, R. Moezelaar, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Appl. Environ. Microb.* **68** (2002) 1561–1568
- [18] K. Adam, A. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras, M. Arsenakis, Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi, *J. Agr. Food Chem.* **46** (1998) 1739–1745
- [19] P.J. Delaquis, K. Stanich, B. Girard, G. Mazza, Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus essential oils, *Int. J. Food Microbiol.* **74** (2002) 101–109
- [20] X. Xianfei, C. Xiaoqiang, Z. Shunying, Z. Guolin, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China, *Food Chem.* **100** (2007) 1312–1315
- [21] S. Sibanda, G. Chigwada, M. Poole, E.T. Gwebu, J.A. Noretto, J.M. Schmidt, A.I. Rea, W.N. Setzer, Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe, *J. Ethnopharmacol.* **92** (2004) 107–111
- [22] M.L. Faleiro, M.G. Miguel, F. Ladeiro, F. Venancio, R. Tavares, J.C. Brito, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*, *Lett. Appl. Microbiol.* **36** (2003) 35–40
- [23] S. Krist, K. Sato, S. Glas, M. Hoferl, J. Saukel, Antimicrobial effect of vapours of terpineol, (*R*)-(-)-linalool, carvacrol, (*S*)-(-)-perillaldehyde and 1,8-cineole on airborne microbes using a room diffuser, *Flavour Frag. J.* **23** (2008) 353–356
- [24] M. Mahboobi, F. Shahcheraghi, M.M. Feizabad, Bactericidal effects of essential oils from clove, lavender and geranium on multi-drug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Iran. J. Biotechnol.* **4** (2006) 137–140
- [25] J.C. Matasyoha, J.J. Kiplimoa, N.M. Karubiub, T.P. Hailstorks, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Satureja biflora* (Lamiaceae), *B. Chem. Soc. Ethiopia* **21** (2007) 249–254
- [26] P. Owlia, H. Sadari, I. Rasooli, F. Sefidkon, Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions, *Iran. J. Pharm. Res.* **8** (2009) 107–114
- [27] E. Ipek, H. Zeytinoglu, S. Okay, B.A. Tuyulu, M. Kurkcuoglu, K.H.C. Baser, Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test, *Food Chem.* **93** (2005) 551–556
- [28] S. Hoet, C. Stévigny, M.F. Hérent, J. Quetin-Leclercq, Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*, *Planta Med.* **72** (2006) 480–482
- [29] K. Cal, Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles, *Planta Med.* **72** (2006) 311–316.

SUMMARY**ANTIBACTERIAL ACTIVITY CHEMICAL COMPOSITION RELATIONSHIP OF THE ESSENTIAL OILS FROM CULTIVATED PLANTS FROM SERBIA**

Nemanja S. Stanković¹, Ljiljana R. Čomić², Branislava D. Kocić³, Dejan M. Nikolić⁴, Tatjana M. Mihajilov-Krstević⁵, Budimir S. Ilić⁶, Dragoljub L. Miladinović⁶

¹Department of Sanitary Microbiology, Institute of Public Health, Niš, Serbia

²Department of Biology and Ecology, Faculty of Science and Mathematics, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Department of Microbiology, School of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

⁴Department of Sanitary Chemistry, Institute of Public Health, Niš, Serbia

⁵Department of Biology and Ecology, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš, Niš, Serbia

⁶Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

(Scientific paper)

The antibacterial effects of essential oils from Serbian cultivated plants, *Thymus vulgaris* L. (Lamiace) and *Lavandula angustifolia* L. (Lamiace) on different bacteria were investigated, with an emphasis on an antibacterial activity–chemical composition relationship. Essential oil was obtained from airdried aerial parts of the plants by hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The essential oil analyses were performed simultaneously by gas chromatography (GC) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) systems. The main constituents of thyme oil were thymol (59.95%) and *p*-cymene (18.34%). Linalyl acetate (38.23%) and linalool (35.01%) were main compounds in lavender oil. The antibacterial activity of the essential oils samples was tested towards 5 different bacteria: laboratory control strain obtained from the American Type Culture Collection and clinical isolates from different pathogenic media. Gram-negative bacteria were represented by *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43895 and *Salmonella enteritidis* ATCC 9027 while researched Gram-positive strains were *Bacillus cereus* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Essential oils from thyme have been found to have antimicrobial activity against all microorganisms tested, with a range of MIC values from 0.025 to 0.10 µl/ml and MBC values from 0.05 to 0.78 µl/ml. Lavender oils demonstrated MIC values from 0.025 to 0.20 µl/ml and MBC values from 0.05 and 0.78 µl/ml. Reference antibiotic tetracycline was active in concentrations between 0.025 and 0.05 µl/ml. The Gram-positive bacteria were more sensitive to the essential oil of thyme, while Gram-negative bacteria were more sensitive to the essential oil of lavender. Essential oils from thyme and lavender may be used at low concentrations for prevention and treatment of infective diseases in animals and humans caused by pathogenic bacterial species.

Keywords: *Thymus vulgaris* • *Lavandula angustifolia* • Antibacterial activity