

Утегенова Г.А.^{1,2*}, Паллистер К.Б.³, Войич Ю.М.³,
Озек Г.⁴, Озек Т.⁴, Кирпотина Л.Н.³, Щепеткин И.А.^{3,5}, Кушнарченко С.В.¹

¹Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

³Университет Штата Монтана, Соединённые Штаты Америки, г. Бозмен

⁴Анатолийский университет, Турция, г. Эскишехир

⁵Центр RASA, Томский политехнический университет, Россия, г. Томск

*e-mail: gulzhakhan_utegen@mail.ru

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ *ARTEMISIA* И *THYMUS* В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) является возбудителем многих заболеваний, в первую очередь, инфекций кожных и мягких тканей. Возникновение устойчивых к антибиотикам штаммов, таких как MRSA, требует поиска новых средств для борьбы с этим патогеном, в частности, среди природных соединений. Эфирные масла являются природными органическими соединениями, которые обладают широким спектром биологической активности: антимикробная, противовирусная, антиоксидантная, противовоспалительная и иммуномодулирующая. В настоящей работе впервые определена антибактериальная активность эфирных масел, выделенных из 5 видов растений Казахстана: *Artemisia kotuchovii* Kupr., *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit., *Thymus crebrifolius* (Klokov), *Thymus marschallianus* Willd. и *Thymus rasitatus* (Klokov) в отношении MRSA USA300. Антибактериальную активность эфирных масел определяли с помощью измерения кинетики поглощения света бактериальной суспензией путем расчета ингибирующей концентрации (IC_{25}), при которой происходило ингибирование роста микроорганизмов на 25%. Наибольшим ингибирующим эффектом на рост MRSA обладали эфирные масла *A. scoparia*, *T. marschallianus* и *T. rasitatus* (IC_{25} = 24,5; 30,9 и 32,7 мкг/мл, соответственно); эфирное масло *T. crebrifolius* показало низкую активность (IC_{25} = 73,0 мкг/мл). Эфирное масло *A. kotuchovii* не проявило активности даже при самой высокой исследованной концентрации 100 мкг/мл.

Ключевые слова: эфирные масла, антибактериальная активность, метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Utegenova G.A.^{1,2*}, Pallister K.B.³, Voyich J.M.³,
Ozek G.⁴, Ozek T.⁴, Kirpotina L.N.³, Schepetkin I.A.³, Kushnarenko S.V.¹

¹Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

³Department of Microbiology and Immunology, Montana State University, The United States of America, Bozeman

⁴Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Turkey, Eskishehir

⁵RASA Center in Tomsk, Tomsk Polytechnic University, Russian, Tomsk

*e-mail: gulzhakhan_utegen@mail.ru

Antibacterial activity of essential oils from some *Artemisia* and *Thymus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the causative agent of many diseases, firstly, of skin and soft tissues infections. The emergence of antibiotic-resistant strains, such as MRSA requires the search for new agents to withstand this pathogen, in particular among natural compounds. Essential

oils are natural organic compounds that have a wide spectrum of biological activity: antimicrobial, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory. The present work for the first time has determined an antibacterial activity of essential oils isolated from 5 plants of Kazakhstan: *Artemisia kotuchovii* Kupr., *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit., *Thymus crebrifolius* (Klokov), *Thymus marschallianus* Willd. and *Thymus rasilatus* (Klokov) in regard to MRSA USA300. Antibacterial activity of essential oils was defined by measuring the light absorption kinetics of bacterial suspension using calculation of the inhibitory concentration (IC_{25}) at which the growth of microorganisms was inhibited to 25%. *A. scoparia*, *T. marschallianus* and *T. rasilatus* essential oils ($IC_{25} = 24.5$; 30.9 and 32.7 $\mu\text{g/ml}$, respectively) possess the high inhibitory effect on increase of MRSA; *T. crebrifolius* essential oil showed low activity ($IC_{25} = 73.0 \mu\text{g/ml}$). *A. kotuchovii* essential oil did not show activity even at the highest tested concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$.

Key words: essential oils, antibacterial activity, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Утегенова Г.А.^{1,2*}, Паллистер К.Б.³, Войич Ю.М.³,
Озек Г.⁴, Озек Т.⁴, Кирпотина Л.Н.³, Щепеткин И.А.^{3,5}, Кушнарченко С.В.¹

¹Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

³Микробиология және Иммунология бөлімі, Монтана Штаты университеті,
Америка Құрама Штаттары, Бозмен қ.

⁴Фармакогнозия бөлімі, фармацевтика факультеті, Анадолу университеті, Түркия, Эскишехир қ.

⁵Томсктағы RASA орталығы, Томск политехникалық университеті, Ресей, Томск қ.

*e-mail: gulzhakhan_utegen@mail.ru

Метициллин-тұрақты *Staphylococcus aureus* қатысты *Artemisia* және *Thymus* кейбір түрлерінің эфир майларының антибактериальды белсенділігі

Метициллин-резистентті *Staphylococcus aureus* (MRSA) көптеген инфекция түрлерінің себепкері, бірінші кезекте тері және жұмсақ ұлпалардың инфекцияларын туғызады. Антибиотиктерге тұрақты MRSA сияқты штамдардың пайда болуы осы патогенге қарсы күресу үшін табиғи қосылыстардың арасынан жаңа заттарды іздеуді қажет етеді. Эфир майлары кең спектрлі антимикробтық, антивирустық, антиоксиданттық, қабынуға қарсы және иммуномодульдеуші сияқты биологиялық белсенділіктерге ие табиғи органикалық қосылыстар. Берілген жұмыста Қазақстанның 5 өсімдігінен: *Artemisia kotuchovii* Kupr., *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit., *Thymus crebrifolius* (Klokov), *Thymus marschallianus* Willd. және *Thymus rasilatus* (Klokov) эфир майларының MRSA USA300 қатысты антибактериальды белсенділігі анықталды. Эфир майларының антибактериальды белсенділігін бактериальды суспензиямен жарықтың жұтылуын өлшеп, микроорганизмдердің өсуінің 25% тежелуі жүзеге асқан тежеуші концентрациясын (IC_{25}) есептеу арқылы анықтадық. MRSA өсуіне ең жоғары тежеуші әсерді *A. scoparia*, *T. marschallianus* және *T. rasilatus* эфир майлары көрсетті ($IC_{25} = 24,5$; 30,9 және 32,7 мкг/мл, сәйкесінше); *T. crebrifolius* эфир майы төмен белсенділікке ие болды ($IC_{25} = 73,0$ мкг/мл). *A. kotuchovii* эфир майы тіпті зерттелген ең жоғары 100 мкг/мл концентрацияда да белсенділік көрсетпеді.

Түйін сөздер: эфир майлары, антибактериальды белсенділік, метициллин-резистентті *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Введение

Эфирные масла представляют собой сложный комплекс различных летучих органических соединений (Baser K.H.C., Vuchbauer G., 2010: 991; Ткачев А.В., 2008: 969). Показано, что эфирные масла обладают антибактериальной (Burt S., 2004: 226), противогрибковой (Cavaleiro C., 2015: 249), противовирусной (Edris A.E., 2007: 315), инсектицидной (Panella N.A., 2005: 355), антиоксидантной (Yu L.L., 2005: 723), противоопухолевой (Sylvestre S., 2005: 299) и противовоспалительной (Azab A., 2016: 1321) активностями. Некоторые масла также используются для кон-

сервирования пищевых продуктов, в ароматерапии и парфюмерной промышленности. Эфирные масла действуют на биохимические процессы в клетках микроорганизмов путем инактивирования ферментов, влияния на текучесть клеточных мембран и увеличения их проницаемости (Santiesteban-López A., 2007: 486; Oussalah M., 2006: 1046). В ряде исследований приводятся экспериментальные данные, что эфирные масла оказывают антимикробное действие на устойчивые формы микроорганизмов, например, на стафилококки, резистентные к антибиотикам (Dryden M.S., 2004: 283; Caelli M., 2000: 236; Cha J.D., 2005: 186).

Метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus* (MRSA) является одним из основных возбудителей кожных инфекций и инфекций мягких тканей. MRSA устойчив ко всем классам β -лактамовых антибиотиков, а некоторые штаммы MRSA оказались также устойчивыми к клиндамицину и эритромицину (Deleo F.R., 2010: 1557). В США большинство инфекций кожных и мягких тканей вызваны MRSA штаммом USA300, который также может вызывать серьезные инвазивные болезни. Учитывая высокую степень трансмиссивности USA300, возможно, в будущем этот штамм *S. aureus* может стать проблемой во всем мире (Long D.R., 2013: 241; Li M., 2009: 5883; Kennedy A.D., 2008: 1327). Дальнейшее использование антибиотиков подвергается риску, так как они теряют активность против MRSA. Альтернативой использованию антибиотиков могут служить нетрадиционные методы лечения, которые включают растительные экстракты и другие природные компоненты, в том числе и эфирные масла (Caelli M., 2000: 236). В частности, сообщается что для уменьшения назальной колонизации MRSA эфирное масло чайного дерева было столь же эффективным, как и стандартная терапия на основе антибиотиков (Dryden M.S., 2004: 287). Многие эфирные масла растений рода *Artemisia* обладают антимикробной активностью. Например, было показано, что эфирное масло *A. scoraria* проявляет сильную противомикробную активность против облигатных анаэробных бактерий *Fusobacterium nucleum*, *Prevotella intermedia* и *Porphyromonas gingivalis* (Cha J.D., 2005: 189). Эфирные масла видов *Thymus* считаются наиболее активными из-за высокого содержания в их составе фенольных соединений, таких как тимол и карвакрол, которые обладают множеством биологических свойств: антимикробной активностью против широкого спектра микроорганизмов (Nostro A., 2007: 519; Lambert R.J., 2001: 453), противовоспалительной, антиоксидантной, гепатопротекторной и противоопухолевой (Braga P.C., 2006: 130; Aeschbach R., 1994: 31; Alam K., 1999: 159; Kang S.H., 2016: 2837). В настоящей работе была исследована антибактериальная активность эфирных масел видов *Artemisia* и *Thymus*, произрастающих на территории Казахстана, против MRSA.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы 5 видов растений Казахста-

на, относящиеся к 2 семействам, собранные в естественных местах произрастания: 2 вида семейства Asteraceae (сложноцветные): *Artemisia kotuchovii* Kupr. (полынь Котухова), и *Artemisia scoraria* Waldst. & Kit. (полынь веничная или полынь метельчатая); 3 вида семейства Lamiaceae (губоцветные): *Thymus crebrifolius* (Klokov) (тимьян частолистный), *Thymus marschallianus* Willd. (тимьян маршаллиевский) и *Thymus gasitatus* (Klokov) (тимьян бритый).

Сбор растительного материала и экстракция эфирных масел из растительного сырья

Сбор образцов растений проводили согласно методике рандомизированного отбора с указанием географических координат точки сбора (широта, долгота, высота над уровнем моря), определяемых с помощью GPS-навигатора eTREX@H («Garmin», Тайвань). Растения были собраны в 2015 г. в фазе цветения. На территории Алматинской области был собран растительный материал *A. scoraria*. В восточном Казахстане собран узлокальный эндем Казахстанского Алтая *A. kotuchovii* и *T. marschallianus*. В горах Бектау-Ата – эндемичный вид *T. gasitatus*; в горах Улытау – эндемик *T. crebrifolius*.

Получение эфирных масел из надземных частей растений проводили методом гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджера («Идам», Турция) по методу, описанному в Европейской фармакопее [Европейский директрат по качеству лекарственных средств, Совет Европы, Страсбург, Франция, 2014], из воздушно сухой массы надземной части растения. Количественный выход эфирных масел вычисляли в объемно-весовых процентах в расчете на воздушно-сухую массу растительного материала.

Идентификация компонентов эфирных масел

В полученных образцах эфирных масел был определен компонентный состав методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (GC-FID) и масс-спектрометрией (GC/MS) с использованием системы Agilent 5975 GC-MSD («Agilent», США; SEM Ltd., Турция) (Özek G., 2010: 741). Компоненты эфирных масел идентифицированы путем сравнения их хроматографических пиков времени удерживания со стандартами, проанализированными в этих же условиях, а также путем сравнения индекса удерживания (индекс Ковача) с литературными данными.

Определение антимикробной активности эфирных масел

Антимикробная активность была определена в отношении метициллин-резистентного

штамма *Staphylococcus aureus* USA300 (LAC) из коллекции Отдела микробиологии и иммунологии Университета Штата Монтана, США с помощью измерения кинетики поглощения света бактериальной суспензией с использованием спектрофотометра SpectraMax 190 microplate reader («Molecular Devices», США). Антибиотик спектиномицин был использован в качестве позитивного контроля, а диметилсульфоксид (ДМСО) был протестирован как негативный контроль.

Культура бактерий. Культуру бактерий на трипсин-соевой среде (TSB) инкубировали при 37°C на шейкере в течение 12 ч. После инкубирования бактерии разводили в соотношении 1:200 в 20 мл трипсинового соевого бульоне с 0,5% глюкозой. MRSA культивировали до достижения середины экспоненциальной фазы роста, при этом оптическая плотность при длине волны 600 нм составляла 1,5 ед. Оптическую плотность регистрировали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США). Бактерии высевали на трипсин-соевую среду с агаром, и на следующий день определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ).

Концентрации эфирных масел. Растворы эфирных масел (10 мкг/мл) были приготовлены в ДМСО. Были протестированы пять различных концентраций эфирных масел: 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 мкг/мл при конечной концентрации ДМСО 1%.

Измерение подавления роста бактерий эфирными маслами. Культуру бактерий (2,5x10⁷ КОЕ/мл) повторно суспендировали на среде TSB и инкубировали в течение 4 ч при температуре 37°C с пятью различными концентрациями эфирных масел в 96-луночных планшетах, предназначенных для культур тканей. Антибиотик спектиномицин был растворен в воде (50 мг/мл) при конечной концентрации 500 мкг/мл. Подавление роста бактерий контролировали по изменению оптической плотности при длине волны $\lambda = 600$ нм с использованием прибора SpectraMax 190 Microplate Reader («Molecular Devices», США). Оптическая плотность регистрировалась каждые 5 мин в течение 4 ч при 37°C. Ингибирующий эффект эфирных масел был определен путем расчета концентрации масел, при которой рост бактерий ингибировался на 25% (IC₂₅).

Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистический анализ осуществляли по общепринятым методикам (Лакин Г.Ф., 1990: 289).

Результаты исследования и их обсуждение

Количественный выход эфирных масел, полученных методом гидродистилляции, варьировал в зависимости от вида: *A. scoparia* – 0,7%, *A. kotuchovii* – 0,8%, *T. marschallianus* – 1,4%, *T. rasitatus* – 0,7%, *T. crebrifolius* – 0,2%.

Исследование антимикробной активности эфирных масел в отношении MRSA показало, что проверенные образцы масел обладали различной степенью противомикробного эффекта. В таблице 1 представлены значения ингибирующей концентрации протестированных эфирных масел, при которых наблюдали подавление роста микроорганизмов на 25% (IC₂₅).

Таблица 1 – Антимикробная активность эфирных масел, выделенных из различных видов растений, в отношении метициллин-резистентного штамма *Staphylococcus aureus* USA300 (LAC)

Образцы эфирных масел	IC ₂₅ , мкг/мл (n = 3; M±m)
<i>A. scoparia</i>	24,5±1,6
<i>A. kotuchovii</i>	Н.А.
<i>T. marschallianus</i>	30,9±1,5
<i>T. rasitatus</i>	32,7±6,5
<i>T. crebrifolius</i>	73,0±5,4
Примечания: М – среднее значение; m – стандартное отклонение; Н.А. – активность не выявлена	

Наиболее высокой антимикробной активностью в отношении MRSA обладали эфирные масла *A. scoparia*, *T. marschallianus* и *T. rasitatus* при концентрации 100 мкг/мл. Эфирное масло *T. crebrifolius* показало только небольшую активность (подавление роста MRSA на 40% при концентрации 100 мкг/мл) (Рис. 1). Эфирное масло *A. kotuchovii* не проявило антибактериальной активности против MRSA даже при самой высокой исследованной концентрации 100 мкг/мл.

Изучение динамики действия эфирных масел *A. scoparia*, *T. marschallianus* и *T. rasitatus* на MRSA показало, что эфирные масла при самой высокой концентрации 100 мкг/мл практически полностью тормозят рост MRSA. В качестве примера на Рис. 2 представлены результаты ингибирования роста штамма MRSA USA300 (LAC) эфирным маслом *A. scoparia* при различных концентрациях. Аналогичная закономерность выявлена и для двух других образцов эфирных масел, выделенных из *T. marschallianus* и *T. rasitatus* (данные не показаны). С уменьше-

нием концентрации эфирных масел наблюдался значительный рост MRSA. Эфирные масла при концентрации 6,25 мкг/мл не ингибировали рост MRSA. Микроорганизм без обработки эфирных масел начинал активно размножаться после часа

от начала инкубации. Выявлено, что ДМСО в концентрации 1% не оказывает влияния на рост микроорганизма. Антибиотик спектиномицин в концентрации 500 мкг/мл полностью подавляет рост MRSA (Рис. 2).

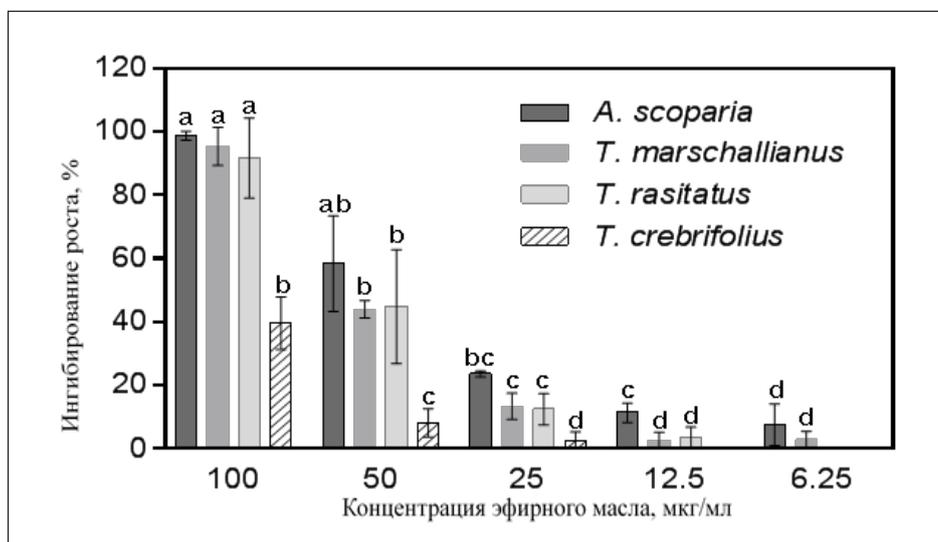


Рисунок 1 – Влияние различных концентраций эфирных масел на рост штамма MRSA USA300 (LAC). Данные, обозначенные разными буквами, достоверно различаются между собой при $p \leq 0,05$

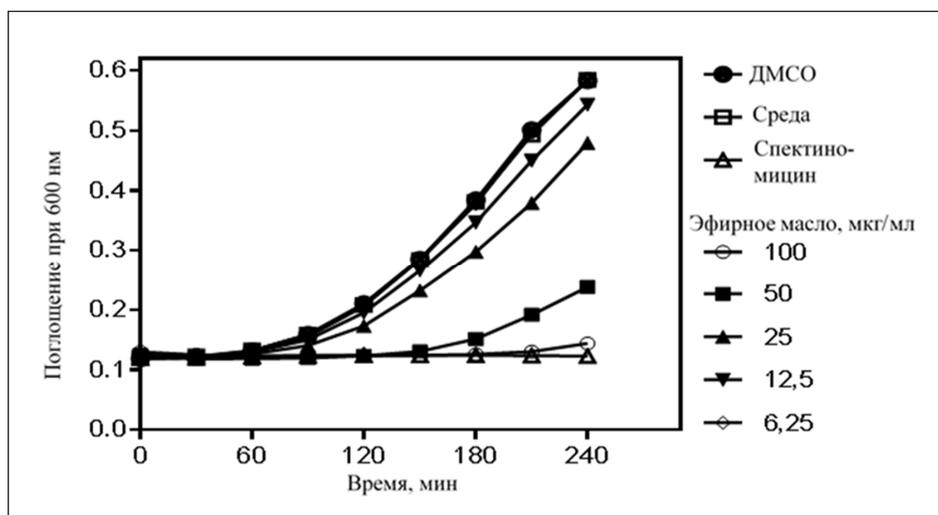


Рисунок 2 – Ингибирование роста штамма MRSA USA300 (LAC) эфирным маслом *Artemisia scoparia* при концентрациях 100; 50; 25; 12,5 и 6,25 мкг/мл и антибиотиком спектиномицин при концентрации 500 мкг/мл

В таблице 2 приведен качественный состав и количественное содержание основных компонентов исследованных эфирных масел. Выявлено, что основными составляющими эфирного

масла *A. scoparia*, которое проявило наибольшую активность, являются монотерпен β -пинен (26,8%) и фенилпропаноид метил эвгенол (24,1%).

Результаты исследования показали что в образцах, которые показали антибактериальную активность преобладают терпеновые соединения. Можно предположить, что за активность тестированных эфирных масел отвечают именно эти соединения, как показано в ряде работ (Bassole I.H., 2012: 2989; Rivas da Silva A.C., 2012: 6305). Основные компоненты эфирного масла *A. scoparia* монотерпены β -пинен и α -пинен являются наиболее активными соединениями, проявляющие антимикробную активность в отношении стафилококков (Leite A.M., 2007: 121).

Во многих работах было выявлено, что терпеноиды также отвечают за антимикробную

активность эфирных масел (Zengin H., 2014: 1773). Содержание тимола в активных образцах эфирных масел, таких как *T. marschallianus* и *T. rasilatus*, составило 45,9 и 13,5%, соответственно, а в эфирном масле, проявившем слабую активность, *T. crebrifolius* лишь 0,1%.

В неактивных образцах эфирных масел содержание терпенов выявлено в очень низких количествах. Антибактериальный эффект эфирных масел тимьянов может быть связан с высоким содержанием монотерпеноида тимола. Тимол является одним из основных компонентов эфирных масел тимьянов, который обладает антимикробной активностью против различных микроорганизмов (Delaquis P.J., 2002: 102).

Таблица 2 – Основные компоненты исследованных эфирных масел

Эфирные масла	Основные классы соединений и компоненты*
<i>A. scoparia</i>	Монотерпены: β -пинен – 26,8%, α -пинен – 6,9%, лимонен – 7,4%, мирцен – 5,0%, (<i>E</i>)- β -оцимен – 3,9%
	Алкины: 1-фенил-пента-2,4-диен – 8,3%
	Сесквитерпеноиды: спатуленол – 2,6%
	Фенилпропаноиды: метил эвгенол – 24,1%
<i>T. marschallianus</i>	Монотерпены: γ -терпинен – 16,2%, <i>p</i> -цимен – 16,1%
	Монотерпеноиды: тимол – 47,2%
<i>T. rasilatus</i>	Монотерпеноиды: α -терпинеол – 25,4%, тимол – 13,5%, линалоол – 9,3%, 1,8-цинеол – 3,0%
	Монотерпены: <i>p</i> -цимен – 14,8%, γ -терпинен – 6,3%, мирцен – 5,5%
	Сесквитерпены: β -кариофиллен – 2,6%
<i>T. crebrifolius</i>	Монотерпеноиды: линалоол – 60,3%, α -терпинеол – 6,8%, 1,8-цинеол – 4,7%, борнеол – 2,6%, гераниол – 2,2%
	Сесквитерпены: β -кариофиллен – 2,1%
<i>A. kotuchovii</i>	Фенилпропаноиды: метил хавикол (= эстрагол) – 75,9%, метил эвгенол – 4,5%
	Монотерпены: (<i>E</i>)- β -оцимен – 4,9%, (<i>Z</i>)- β -оцимен – 3,9%
Примечание: *в таблице указаны компоненты с содержанием >2%	

Работ по действию протестированных нами эфирных масел, выделенных из растений Казахстана, против штамма USA300 (LAC) не найдено, и данные по антибактериальной активности исследованных эфирных масел получены впервые. Эфирные масла *A. scoparia*, *T. marschallianus* и *T. rasilatus* и их компоненты могут быть потен-

циальными антибактериальными природными агентами против MRSA.

Работа выполнена в рамках гранта Министерства образования и науки Республики Казахстан №2117/GF4 «Фармакологические эффекты эфирных масел и их компонентов из растений Казахстана».

Литература

- 1 Baser K.H.C., Buchbauer G. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. – USA: Abingdon: Francis & Taylor Group, CRC Press. – 2010. 991 p. ISBN: 13:978-1-4200-6316-5.
- 2 Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений. – Новосибирск: Офсет. – 2008. 969 с. ISBN: 978-5-85957-056-0.
- 3 Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review // Int. J. Food Microbiol., – 2004. – Vol. 94, No. 3. – P. 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- 4 Cavaleiro C., Salgueiro L., Goncalves M.J., Hrimpleng K., Pinto J., Pinto E. Antifungal activity of the essential oil of *Angelica major* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species // J. Nat. Med. – 2015. – Vol. 69, No. 2. – P. 241-248. DOI: 10.1007/s11418-014-0884-2. 69, 241 (2015).
- 5 Edris A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review // Phytother. Res. – 2007. – Vol.21, No. 4. – P. 308–323. DOI: 10.1002/ptr.2072.
- 6 Panella N.A., Dolan M.C., Karchesy J.J., Xiong Y., Peralta-cruz J., Khasawneh M., Montenieri J.A., Maupin G.O. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar // J. Med. Entomol. – 2005. – Vol. 42, No. 3. – P. 352-358. DOI: 10.1603/0022-2585(2005)042[0352:UONCFP]2.0.CO;2.
- 7 Yu L.L., Zhou K.K., Parry J. Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry and hemp seed oils // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 91, No. 4. – P. 723–729. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.06.044.
- 8 Sylvestre S., Legault J., Dufour D., Pichette A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. // Phytomedicine. – 2005. – Vol. 12, No. 4. – P. 299–304. DOI: 10.1016/j.phymed.2003.12.004.
- 9 Azab A., Nassar A., Azab A.N. Anti-Inflammatory activity of natural products // Molecules. – 2016. – Vol. 21, No. 10. – P. 1321. DOI: 10.3390/molecules21101321.
- 10 Santiesteban-López A., Palou E., López-Malo A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH // J. Appl. Microbiol. – 2007. – Vol. 102, No. 2. – P. 486–497. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03092.x.
- 11 Oussalah M., Caillet S., Lacroix M. Mechanism of action of spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* // J. Food. Prot. – 2006. – Vol. 69, No. 5. – P. 1046-1055. DOI: 10.4315/0362-028X-69.5.1046.
- 12 Dryden M.S., Dailly S., Crouch M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization // J. Hosp. Infect. – 2004. – Vol.56, No. 4. – P.283–286. DOI: 10.1016/j.jhin.2004.01.008.
- 13 Caelli M., Porteous J., Carson C.F., Heller R., Riley T.V. Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection // J. Hosp. Infect. – 2000. – Vol. 46, No. 3. – P.236–237. DOI: 10.1053/j.jhin.2000.0830.
- 14 Cha J.D., Jeong M.R., Jeong S.I., Moon S.E., Kim J.Y., Kil B.S., Song Y.H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris* // Planta Med. – 2005. – Vol. 71, No. 2. – P.186-190. DOI: 10.1055/s-2005-837790.
- 15 Deleo F.R., Otto M., Kreiswirth B.N., Chambers H.F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Lancet. – 2010. – Vol. 375, No. 9725. – P. 1557-1568. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61999-1.
- 16 Long D.R., Mead J., Hendricks J.M., Hardy M.E., Voyich J.M. 18β-Glycyrrhetic acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression. Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – Vol. 57, No. 1. – P. 241-247. DOI: 10.1128/AAC.01023-12.
- 17 Li M., Diep B.A., Villaruz A.E., Braughton K.R., Jiang X., DeLeo F.R., Chambers H.F., Lu Y., Otto M. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, No. 14. – P. 5883-5888. DOI: 10.1073/pnas.0900743106.
- 18 Kennedy A.D., Otto M., Braughton K.R., Whitney A.R., Chen L., Mathema B., Mediavilla J.R., Byrne K.A., Parkins L.D., Tenover F.C., Kreiswirth B.N., Musser J.M., DeLeo F.R., Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Recent clonal expansion and diversification // Proc Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105, No. 4. – P. 1327–1332. DOI: 10.1073/pnas.0710217105.
- 19 Nostro A., Roccaro A.S., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A., Pizzimenti F.C., Cioni P.L., Procopio F., Blanco A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms // J. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 56. – P. 519–523. DOI: 10.1099/jmm.0.46804-0.
- 20 Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol // J. Appl. Microbiol. – 2001. – Vol. 91, No. 3. – P. 453–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.
- 21 Braga P.C., Dal Sasso M., Culici M., Bianchi T., Bordoni L., Marabini L. Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase // Pharmacology. – 2006. – Vol. 77, No. 3. – P. 130-136. DOI: 10.1159/000093790.
- 22 Aeschbach R., Loliger J., Scott B.C., Murcia A., Butler J., Halliwell B., Aruoma O.I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol // Food Chem. Toxicol. – 1994. – Vol. 32, No. 1. – P. 31–36. DOI: 10.1016/0278-6915(94)90033-4.
- 23 Alam K., Nagi M.N., Badary O.A., Al-Shabanah O.A., Al-Rikabi A.C., Al-Bekairi A.M. The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice // Pharmacol. Res. – 1999. – Vol. 40. – P. 159–163. DOI: 10.1006/phrs.1999.0472.

- 24 Kang S.H., Kim Y.S., Kim E.K., Hwang J.W., Jeong J.H., Dong X., Lee J.W., Moon S.H., Jeon B.T., Park P.J. Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 26, No. 1. – P. 2837. DOI: 10.4014/jmb.1506.06073.
- 25 Özek G., Demirci F., Özek T., Tabanca N., Wedge D.E., Khan S.I., Baser K.H.C., Duran A., Hamzaoglu E. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – Vol. 1217, No.5. – P. 741–748. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.086.
- 26 Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва:Высшая школа. – 1990. 352 с. ISBN: 5-06-000471-6.
- 27 Bassole I.H., Juliani H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17. – P. 3989-4006. DOI: 10.3390/molecules17043989.
- 28 Rivas da Silva A.C., Lopes P.M., Barros de Azevedo M.M., Costa D.C., Alviano C.S., Alviano D.S. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17, No. 6. – P. 6305-6316. DOI: 10.3390/molecules17066305.
- 29 Leite A.M., Lima E.O., Souza E.L., Diniz M.F.F.M., Trajano V.N., Medeiros I.A. Inhibitory effect of b-pinene, a-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria // *Braz. J. Pharm. Sci.* – 2007. – Vol. 43, No. 1. – P. 121-126. DOI: 10.1590/S1516-93322007000100015.
- 30 Zengin H., Baysal A.H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy // *Molecules.* – 2014. – Vol. 19, No. 11. – P. 17773-17798. DOI: 10.3390/molecules191117773.
- 31 Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils // *Int. J. Food Microbiol.* – 2002. – Vol. 74, No. 1-2. – P. 101-109. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00734-6.

References

- 1 Baser KHC, Buchbauer G (2010) Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications, Abingdon: Francis & Taylor Group, CRC Press, USA. ISBN: 13:978-1-4200-6316-5.
- 2 Tkachev AV (2008) Research of volatile substances of plants [Issledovanie letuchih veshhestv rastenij]. Ofset, Novosibirsk. pp. 969. ISBN: 978-5-85957-056-0 (In Russian).
- 3 Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94:223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- 4 Cavaleiro C, Salgueiro L, Goncalves MJ, Hrimplpeng K, Pinto J, Pinto E (2015) Antifungal activity of the essential oil of *Angelica major* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Nat. Med.*, 69:241-248. DOI: 10.1007/s11418-014-0884-2. 69, 241 (2015).
- 5 Edris AE (2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.*, 21:308–323. DOI: 10.1002/ptr.2072.
- 6 Panella NA, Dolan MC, Karchesy JJ, Xiong Y, Peralta-cruz J, Khasawneh M, Monteneri JA, Maupin GO (2005) Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. *J. Med. Entomol.*, 42:352-358. DOI: 10.1603/0022-2585(2005)042[0352:UONCFP]2.0.CO;2.
- 7 Yu LL, Zhou KK, Parry J (2005) Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry and hemp seed oils. *Food Chemistry*, 91:723–729. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.06.044.
- 8 Sylvestre S, Legault J, Dufour D, Pichette A (2005) Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12:299–304. DOI: 10.1016/j.phymed.2003.12.004.
- 9 Azab A, Nassar A, Azab AN (2016) Anti-Inflammatory activity of natural products. *Molecules*, 21: 1321. DOI: 10.3390/molecules21101321.
- 10 Santiesteban-López A, Palou E, López-Malo A (2007) Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. *J. Appl. Microbiol.*, 102:486 – 497. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03092.x.
- 11 Oussalah M, Caillet S, Lacroix M (2006) Mechanism of action of spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Prot.*, 69:1046-1055. DOI: 10.4315/0362-028X-69.5.1046.
- 12 Dryden MS, Dailly S, Crouch M (2004) A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *J. Hosp. Infect.*, 56:283–286. DOI: 10.1016/j.jhin.2004.01.008.
- 13 Caelli M, Porteous J, Carson CF, Heller R, Riley TV (2000) Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J. Hosp. Infect.*, 46:236–237. DOI: 10.1053/jhin.2000.0830.
- 14 Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Moon SE, Kim JY, Kil BS, Song YH (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris*. *Planta Med.*, 71:186-190. DOI: 10.1055/s-2005-837790.
- 15 Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF (2010) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 375:1557-1568. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61999-1.
- 16 Long DR, Mead J, Hendricks JM, Hardy ME, Voyich JM (2013) 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57:241-247. DOI: 10.1128/AAC.01023-12.
- 17 Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, Chambers HF, Lu Y, Otto M (2009) Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:5883-5888. DOI: 10.1073/pnas.0900743106.

- 18 Kennedy AD, Otto M, Braughton KR, Whitney AR, Chen L, Mathema B, Mediavilla JR, Byrne KA, Parkins LD, Tenover FC, Kreiswirth BN, Musser JM, DeLeo FR (2008) Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Recent clonal expansion and diversification. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 105:1327–1332. DOI: 10.1073/pnas.0710217105.
- 19 Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F, Blanco AR (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 56:519–523. DOI: 10.1099/jmm.0.46804-0.
- 20 Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.
- 21 Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Bianchi T, Bordoni L, Marabini L (2006) Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology*, 77:130-136. DOI: 10.1159/000093790.
- 22 Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* 32:31–36. DOI: 10.1016/0278-6915(84)90033-4.
- 23 Alam K, Nagi MN, Badary OA, Al-Shabanah OA, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM (1999) The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *Pharmacol. Res.* 40:159–163. DOI: 10.1006/phrs.1999.0472.
- 24 Kang SH, Kim YS, Kim EK, Hwang JW, Jeong JH, Dong X, Lee JW, Moon SH, Jeon BT, Park PJ (2016) Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26:2837. DOI: 10.4014/jmb.1506.06073.
- 25 Özek G, Demirci F, Özek T, Tabanca N, Wedge DE, Khan SI, Baser KHC, Duran A, Hamzaoglu E (2010) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity. *J. Chromatogr. A*, 1217:741–748. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.086.
- 26 Lakin GF (1990) *Biometrics [Biometrija]*. Vysshaja shkola, Moscow, pp. 352. ISBN: 5-06-000471-6 (In Russian).
- 27 Bassole IH, Juliani HR (2012) Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17:3989-4006. DOI: 10.3390/molecules17043989.
- 28 Rivas da Silva AC, Lopes PM, Barros de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS (2012) Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17:6305-6316. DOI: 10.3390/molecules17066305.
- 29 Leite AM, Lima EO, Souza EL., Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA (2007) Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Braz. J. Pharm. Sci.* 43:121-126. DOI: 10.1590/S1516-93322007000100015.
- 30 Zengin H, Baysal AH (2014) Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, 19:17773-17798. DOI: 10.3390/molecules191117773.
- 31 Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 74:101-109. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00734-6.