



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συγκριτική μελέτη αυτοφυούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Origanum dictamnus* ως προς την χημική σύσταση και βιοδραστικότητά τους

Θωμάη Αναστασιάδου

Επιβλέπων καθηγητής:

Πέτρος Α. Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2023

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συγκριτική μελέτη αυτοφυσούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Origanum dictamnus* ως προς την χημική σύσταση και βιοδραστικότητά τους

Comparative study of wild and cultivated populations of the species *Origanum dictamnus* concerning its chemical composition and bioactivity

Θωμάη Αναστασιάδου

Εξεταστική επιτροπή:

Πέτρος Α. Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Χρήστος Παππάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Γαρυφαλλιά Οικονόμου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Συγκριτική Μελέτη Αυτοφυούς και Καλλιεργούμενου Πληθυσμού του είδους *Origanum dictamnus* ως προς την χημική σύσταση και βιοδραστικότητα τους

ΠΜΣ Τρόφιμα Διατροφή και Υγεία, Ειδίκευση: Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών προϊόντων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Στην συγκεκριμένη εργασία ασχοληθήκαμε με την σύγκρισή του αυτοφυούς και καλλιεργούμενου πληθυσμού του είδους *Origanum dictamnus* ως προς την χημική σύσταση και αντιμικροβιακή ιδιότητα προς επιλεγμένους παθογόνους μικροοργανισμούς. Χρησιμοποιήσαμε αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία μαζών ώστε να καθορίσουμε τον χημειότυπο του κάθε δείγματος, ενώ για την αντιμικροβιακή ικανότητα κάναμε μια σειρά πειραμάτων με την μέθοδο της διάχυσης σε πηγαδάκια έναντι δύο θετικών και δυο αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι κύριες ουσίες και στα δύο δείγματα ήταν η καρβακρόλη, το p-κυμένιο και το γ-τερπινένιο ενώ ενδιαφέρουσα ήταν η παρουσία της θυμοκινόνης και της μενθόλης μόνο στο δείγμα του αυτοφυούς δίκταμου. Όσον αφορά την αντιμικροβιακή ικανότητα, με τη μέθοδο αυτή βρέθηκε ότι το αιθέριο έλαιο ήταν πολύ αποτελεσματικό έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων ενώ στους Gram θετικούς μικροοργανισμούς είχε όχι τόσο ισχυρή επίδραση.

Επιστημονική περιοχή: Χημική ανάλυση συστατικών φυτών

Λέξεις κλειδιά: *Origanum dictamnus*, δίκταμος, ενδημικό, σύγκριση χημικής σύστασης, καρβακρόλη

Comparative study of Wild and Cultivated populations of the species *Origanum dictamnus* concerning its chemical composition and bioactivity

MSc Food, Nutrition and Health, Specialization: Study and Exploitation of Natural Products

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of General Chemistry

ABSTRACT

In this essay we dealt with the comparison of the wild and cultivated population of the *Origanum dictamnus* species in terms of chemical composition and antimicrobial properties towards selected pathogenic microorganisms. We used gas chromatography coupled with mass spectrometry to determine the chemotype of each sample, while for the antimicrobial activity we did a series of experiments with the diffusion method in wells against two Gram-positive and two Gram-negative bacteria. The results showed that the main substances in both samples were carvacrol, p-cymene and γ -terpinene, while interesting was the presence of thymoquinone and menthol (in high concentration) only in the wild sample. Regarding the antimicrobial capacity, with this method it was found that the essential oil was very effective against Gram-positive bacteria while it had a not so strong effect on Gram-negative microorganisms.

Scientific area: Chemical analysis of the substances of plants

Key words: *Origanum dictamnus*, endemic, comparison of chemical composition, carvacrol

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου χημείας κ. Πέτρο Ταραντίλη, τόσο για την επίβλεψη όσο και για την βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής. Χωρίς την εμπιστοσύνη και τον εργαστηριακό εξοπλισμό που μου διατέθηκε δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω την συγκεκριμένη εργασία. Οι συμβουλές του καθόλη την διάρκεια ήταν πολύτιμες και η καθοδήγηση που μου δόθηκε απαραίτητη.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Γαρυφαλλιά Οικονόμου, εισηγήτρια του θέματος, καθώς χωρίς εκείνη, δεν θα υπήρχε η δυνατότητα να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Οι ιδέες και η καθοδήγηση και από εκείνη ήταν άκρως πολύτιμες και καλοδεχούμενες.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παππά για την επίβλεψη και την επιστημονική βοήθεια που προσέφερε καθώς ήταν πολύ σημαντικές για την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής εργασίας.

Η διεξαγωγή των πειραμάτων στο GC-MS έγινε με την βοήθεια της κ. Δαφερέρα. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τον χρόνο της καθώς χωρίς τις δικές της γνώσεις δεν θα ήταν εφικτό το συγκεκριμένο πείραμα

Φυσικά θα πρέπει να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Ελένη Κακούρη, η οποία ανέλαβε την εργαστηριακή μου επίβλεψη και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διατριβής μου. Ήταν πάντα διαθέσιμη να με βοηθήσει και να απαντήσει σε οποιαδήποτε απορία μου και οφείλω απέραντη ευγνωμοσύνη για την υπομονή και την καλή διάθεση που είχε απέναντί μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παντελή Νατσκούλη, υπεύθυνο των εργαστηριακών πειραμάτων της Μικροβιολογίας. Υπό την καθοδήγηση του κύριου Πανάγου Ευσταθίου, καταφέραμε να φέρουμε εις πέρας τα πειράματα για την αντιμικροβιακή ιδιότητα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστηρίου μικροβιολογίας που μας βοήθησαν επίσης με κάποιες τεχνικές.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου σε αυτό το μεταπτυχιακό, που μαζί πορευτήκαμε, ανταλλάσαμε ιδέες και περάσαμε όμορφα σε αυτό το ταξίδι.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Παρουσίαση φυτικού οργανισμού.....	7
1.1.2. Ταξινόμηση.....	8
1.1.3. Ιστορική αναδρομή και Εθνοβοτανική.....	9
1.1.4. Καθεστώς προστασία φυτικού είδους.....	10
1.1.5. Καλλιέργεια του <i>Origanum dictamnus</i>	11
1.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες- Πτητικά συστατικά.....	11
1.2.1. Τερπενοειδή <i>Origanum dictamnus</i>	12
1.2.2. Βιοσυνθετικό μονοπάτι.....	12
1.3 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών.....	13
1.3.1. Αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών.....	14
1.4. Αντιμικροβιακή ιδιότητα.....	14
1.4.1. Τρόπος δράσης εναντίων ορισμένων παθογόνων.....	15
1.4.2. Παρουσίαση μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν.....	16
1.4.3. Χρήσεις & Εφαρμογές (τρόφιμα, γεωργία, υγεία, φαρμακολογία).....	19
2. Πειραματική διαδικασία- Υλικά & Μέθοδοι.....	20
2.1 Προμήθεια φυτικού υλικού.....	20
2.1.1. Περιοχή.....	21
2.2 Υδροαπόσταξη.....	22
2.3 GC-MS.....	22
2.4 Πειράματα για αντιμικροβιακή δράση.....	23
3. Αποτελέσματα & Συζήτηση.....	26
3.1 Υδροαπόσταξη & απόδοση αιθέριων ελαίων.....	27
3.2 Αποτελέσματα πειραμάτων για αντιμικροβιακή δράση.....	29
3.3 Αποτελέσματα χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας.....	34
4. Πίνακες, γραφήματα και πίτες αποτελεσμάτων.....	39
5. Παράρτημα χρωματογραφημάτων και φασμάτων.....	43

1. Εισαγωγή

Από την αρχαιότητα ακόμη η ανάγκη του ανθρώπου για θεραπεία τον οδήγησε στην χρήση διάφορων φυτών που χαρακτηρίζονταν από θεραπευτικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται σε διάφορα χημικά συστατικά των φυτών, τα οποία αποκαλούμε δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι μια ομάδα ουσιών που ενώ δεν έχει άμεση σχέση με τις πρωτογενείς ανάγκες του φυτού, φαίνεται να του προσδίδουν επιπλέον ιδιότητες που το προστατεύουν και θωρακίζουν την θέση του στο οικοσύστημα, ενώ του δίνουν το προβάδισμα στον εξελικτικό αγώνα των οργανισμών. Αυτοί οι μεταβολίτες τραβούν ιδιαίτερες το ενδιαφέρον των ερευνητών καθώς μπορούν να αποτελέσουν σημαντική βάση εξαγωγής και δημιουργίας φαρμακευτικών προϊόντων με ποικίλες ιδιότητες. Η παρουσία των δευτερογενών μεταβολιτών ταυτίζεται με τα λεγόμενα φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά. Σε αυτά ανήκουν τα φυτά που εκκρίνουν ουσίες, οι οποίες πολλές φορές έχουν χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιούνται ευρέως στην φαρμακευτική, την κοσμετολογία αλλά και την μαγειρική.



1.1. Παρουσίαση φυτικού οργανισμού

Ο δίκταμος (*Origanum dictamnus*) είναι ένα πολυετές φυτό, είδος ενδημικό της Κρήτης και το συναντάμε κυρίως σε απότομες βραχώδεις πλαγιές και φαράγγια του νησιού (Krigas et al., 2015). Πρόκειται για ένα μοναδικό φυτό της οικογένειας Lamiaceae, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην παράδοση της Κρήτης τόσο για τους μύθους στους οποίους πρωταγωνιστεί, όσο και για τις θεραπευτικές ιδιότητες που του προσδίδονται εδώ και αιώνες.(Mitropoulou et al., 2015).

1.1.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο δίκταμος είναι ένα πολυετές φρύγανο της Κρήτης. Πρόκειται για ένα μικρό θαμνώδες πράσινο φυτό (νανοφυές) που φτάνει τα 35cm. Τα φύλλα του είναι ωσειδή ή σχεδόν ισοδιαμετρικά (μήκος 8-9mm) και είναι τραχειά στην κάτω επιφάνεια με πλούσια δικτυωτή νεύρωση και καλυμμένα με πυκνό λευκό τρίχωμα στην πάνω επιφάνειά τους (Σκρουμπής, 1990, Vrachnakis, 2003). Οι μίσχοι του είναι ανοδικοί και έχουν χρώμα κιτρινωπό ή μωβ ή καφέ(Liolios et al., 2010). Τα άνθη είναι ανοιχτό ροζ ή μωβ χρώμα(εικ.2), διατεταγμένα σε κορυμβους, διανθείς κεφαλιόμορφους με μορφή ιούλων λυκίσκου και εκφύονται από βράκτια με σχήμα ημικυκλικό και μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από κάλυκα (7-10mm). Ο κάλυκας είναι πράσινος και κυλινδρικός, δίχειλος με το άνω χείλος μακρύτερο και πλατύτερο από το κάτω. Η στεφάνη είναι δίχειλη, ροζ, με το άνω χείλος δίλοβο και το κάτω τρίλοβο. Οι στήμονες είναι τέσσερις και προεξέχουν ενώ ο στύλος έχει διχαλωτή μορφή(Σκρουμπής, 1990). Τα πράσινα φύλλα υπάρχουν σε έως και 15 ζεύγη ανά μίσχο ενώ τα μη-αδενώδη τριχώματα (trichomes) πάνω στα φύλλα που προσδίδουν το γκριζωπό ασημένιο επίχρισμα και την βελούδινη υφή φτάνουν σε μήκος τα 2mm και είναι διακλαδισμένα. Ο διακλαδισμός αυτός φαίνεται να είναι μοναδικός για το είδος *O.dictamnus* ενώ δεν παρατηρείται σε άλλα είδη του γένους *Origanum* όπως το *O.vulgare*, *O.onites* κ.ά.(Bobasalidis A.M., 2002). Υπάρχει και ένα ποσοστό αδενωδών τριχωμάτων στο φυτό, αλλά πολύ μικρότερο από αυτό που υπάρχει σε άλλα είδη του γένους και αυτό οφείλεται πιθανόν στις αντίξοες συνθήκες στις οποίες επιβιώνει το συγκεκριμένο είδος (Bobasalidis A.M., 2002; Bosabalidis & Tsekos, 1982; Liolios et al., 2010) (Lianoroulou & Bosabalidis, 2014). Υποχρεωτικά χασμόφυτο, δηλαδή φυτρώνει μόνο σε απότομα βράχια ασβεστόλιθου ή σχιστόλιθου, κυρίως σε σκιερά μέρη άλλα και επαρκή έκθεση στον ήλιο. Το υψόμετρο στο οποίο το βρίσκουμε είναι από 300m έως 1900m πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας.



1.1.2. Ταξινόμηση

Ο δίκταμος ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει περίπου 230 γένη και 7000 είδη (Ταμοκου, 2017). Περιλαμβάνει αγγειόσπερμα από όλο το κόσμο και είναι αρκετά μελετημένη ομάδα όσον αφορά τους δευτερογενείς της μεταβολίτες και την οικονομική και φαρμακευτική τους σημαντικότητα. Ειδικότερα τα αιθέρια έλαια της οικογένειας Lamiaceae θεωρούνται σημαντικά και έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον των μελετητών(Daferera et al., 2002; Werker, 1993).

Πίνακας 1 Ταξινόμηση του είδους *Origanum dictamnus*

Βασίλειο	Φυτά
Αθροισμα	Spermatophyta
Υποάθροισμα	Magnoliophytina
Κλάση	Magnoliatae
Υποκλάση	Asteridae
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	Lamiaceae (Χειλανθή)
Γένος	<i>Origanum</i>
Είδος	<i>dictamnus</i>

1.1.3. Ιστορική αναδρομή & εθνοβοτανική

Το ίδιο το φυτό φαίνεται να συνδέεται με το όρος Δίκτυ (από όπου και πιστεύεται ότι προέρχεται η ονομασία του) και την θεά Δίκτυννα, μινωική θεότητα αντίστοιχη της θεάς Άρτεμης, η οποία πιστεύονταν ότι βοηθούσε τις γυναίκες στον τοκετό και άλλες γυναικολογικές παθήσεις όπως αμηνόρροια κλπ.(Martínez-Francés et al., 2015). Άλλα ονόματα του φυτού όπως έρωντας, στομαχόχορτο, μαλλιαρόχορτο, σταματοχορτο κ.α υποδηλώνουν την σημασία που είχε για τον τοπικό πληθυσμό είτε φαρμακευτικά είτε στην παραδοσιακή κουλτούρα του τόπου. «Έρωντας» γιατί η συλλογή του ήταν τόσο δύσκολη στα απόκρημνα βράχια, που μόνο ένας ερωτευμένος θα ρίσκαρε να τον μαζέψει και να τον δωρίσει στην αγαπημένη του. Η ονομασία αυτή διατηρείται μέχρι και σήμερα στον τόπο. «Σταματοχορτο» διότι σταματούσε το αίμα να τρέχει από τις πληγές ενώ «στοματόχορτο» γιατί λειτουργούσε ως αντισηπτικό για την στοματική κοιλότητα. Από την αρχαιότητα , βλέπουμε ότι ο δίκταμος θεωρούνταν «πανάκεια», δηλαδή φάρμακο για όλες τις ασθένειες(Liolios et al., 2010). Το χρησιμοποιούσαν λοιπόν για στομαχικές διαταραχές, γαστρικά έλκη, για το γαστρεντερικό σύστημα γενικότερα, για προβλήματα στον σπλήνα, κατά των ρευματισμών, για τον τοκετό καθώς και για άλλα γυναικολογικά προβλήματα (Liolios et al.,



2010; Martínez-Francés et al., 2015). Το συχνότερο που αναφέρεται στην βιβλιογραφία βέβαια όσον αφορά την ιστορία του δίκταμου είναι η ιδιότητά του να γιατρεύει τις πληγές. Η πιο ενδιαφέρουσα αναφορά έρχεται από τον Αριστοτέλη (4^{ος} αιώνας π.Χ.), ο οποίος αναφέρει ότι οι άγριες αίγες έτρωγαν δίκταμο όποτε είχαν πληγωθεί από βέλη, καθώς αυτό βοηθούσε στην αποβολή του βέλους και την γρηγορότερη θεραπεία της πληγής (Liolios et al., 2010; Martínez-Francés et al., 2015; Skrubis, 1979). Ο κύριος τρόπος με τον οποίο προμηθεύονταν οι άνθρωποι τον δίκταμο ήταν η συλλογή από τα απότομα βράχια και φαράγγια, οργανωμένοι σε ομάδες που είχαν διάφορα ονόματα όπως «Μαζώχτάδες», «Ερωντάδες», «Βοτανολόγοι». Η ενασχόληση αυτή ήταν επικίνδυνη καθώς πολλές φορές γίνονταν ατυχήματα και έτσι σιγά σιγά οι κρητικοί άρχισαν την καλλιέργεια του δίκταμου (Μετα το 1920) ώστε να προμηθεύονται ευκολότερα το υλικό(Liolios et al., 2010).

1.1.4. Καθεστώς προστασίας φυτικού είδους

Οι άγριοι πληθυσμοί του ενδημικού αυτού τάξου κινδυνεύουν λόγω της υπερβολικής και αλόγιστης συλλογής και μάλιστα βρίσκονται υπό κρατική προστασία σύμφωνα με την ανανεωμένη σύμβαση της Βέρνης για την διατήρηση της άγριας χλωρίδας και πανίδας της ευρωπαϊκής ηπείρου αλλά και ορισμένων αφρικανικών κρατών (*Bern Convention, 2002*). Επιπλέον φύεται στο φαράγγι της Σαμαριάς, στο οποίο λόγω ειδικής προστασίας (*Natura 2000*) σαφώς και απαγορεύεται η συλλογή του. Παρόλα αυτά, συνεχίζει και συλλέγεται παράνομα με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί του να μειώνονται εκθετικά στο φυσικό του περιβάλλον. (*Bern Convention, 2002. Bern/Berne, 19.IX.1979. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. APPENDIX I. Strictly Protected Flora Species. Http://Conventions.Coe.Int/Treaty/FR/Treaties/Html/104-1.Htm., 2002*) . Ακόμη στην λίστα της IUCN έχει κατηγοριοποιηθεί ως κινδυνεύον είδος και για αυτό προστατεύεται από το ελληνικό κράτος με το προεδρικό διάταγμα 67/81(Dilmoroulos et al., 2016). Ο δίκταμος αποτελεί παράδειγμα ενός είδους που έχει υποστεί υπερεκμετάλλευση με ταυτόχρονη απουσία ενός πλάνου διατήρησης και βιώσιμης εκμετάλλευσης και αυτό γιατί χρησιμοποιείται στην βιομηχανία των καλλυντικών και των τροφίμων ως θεραπευτικό είδος ή ως καρύκευμα(Krigas et al., 2015). Η δυνατότητα του δίκταμου για σωστή και βιώσιμη εκμετάλλευση με πολλά οφέλη είναι τεράστια, αφού πρώτα λάβουμε υπόψιν και την προστασία του(Sarropoulou et al., 2023). Η τρωτότητα και η ευαισθησία του είδους (είναι ένα σπάνιο ενδημικό είδος), σε συνδυασμό με την υπερβολική συλλογή του έχουν οδηγήσει στην ραγδαία μείωση των φυσικών πληθυσμών. Για να επιλυθεί αυτή η κατάσταση είναι σημαντικό να καταφύγουμε στην καλλιέργεια του, όπως και έχει γίνει.

1.1.5. Καλλιέργεια του *Origanum dictamnus*

Όπως αναφέρθηκε, ήταν επιτακτικό να καταφύγουμε στην καλλιέργεια του κρητικού δίκταμου για να διατηρήσουμε τους άγριους πληθυσμούς και να τους προστατέψουμε από τον αφανισμό. Η συνήθης διαδικασία του πολλαπλασιασμού έχει αποδειχθεί αδύναμη καθώς υπάρχει χαμηλός ρυθμός βλάστησης των σπερμάτων του φυτού και μέτρια απόδοση όσον αφορά την αύξηση ριζώματος από μοσχεύματα (Sarroroulou et al., 2023). Είναι απαραίτητο λοιπόν να γίνουν περαιτέρω *in vitro* έρευνες όσον αφορά τις βέλτιστες συνθήκες βλάστησης και ανάπτυξης ώστε να καταλάβουμε τις ανάγκες της καλλιέργειας του συγκεκριμένου φυτού και να προχωρήσουμε σε μαζικότερη καλλιέργεια.

1.2. Δευτερογενείς Μεταβολίτες- Πτητικά συστατικά

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικά μόρια τα οποία παράγονται από τα φυτά, τα βακτήρια και τους μύκητες και αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού. Δηλαδή δεν σχετίζονται με πρωτογενείς λειτουργίες του οργανισμού όπως είναι η αναπνοή, η φωτοσύνθεση κ.ά. αλλά με δευτερογενείς λειτουργίες του μεταβολισμού οι οποίες ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένες στρεσογόνες καταστάσεις όπως περιβαλλοντικές αστάθειες, άμυνα του οργανισμού έναντι πιθανών θηρευτών, UV ακτινοβολία, ανταγωνισμός με άλλα είδη κ.λπ.. Αυτοί οι μεταβολίτες αποτελούν τον χημειότυπο του φυτού και πολλές φορές ανάμεσά τους βρίσκονται σημαντικά φαρμακευτικά μόρια που έχει χρησιμοποιήσει ο άνθρωπος για την βελτίωση της ζωής του ή την θεραπεία ασθενειών (Lattanzio, 2013). Έχει βρεθεί σύμφωνα με την βιβλιογραφία πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών στον δίκταμο (Mitropoulou et al., 2015; Sarroroulou et al., 2023; Sivropoulou et al., 1996). Πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και κουμαρίνες από το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού (Harvala, 1987). Από το εκχύλισμα με νερό ως διαλύτη απομονώθηκαν κουμαρικό οξύ, φερούλικό οξύ και κατεχίνες (Chatzopoulou et al., 2010). Ακόμη, από τα εκχυλίσματα με πολικούς διαλύτες απομονώθηκαν κυρίως μονοτερπένια, αλικυκλικά παράγωγα, φλαβονοειδή, ροσμαρινικό οξύ, θυμοκινόνη κ.ά (Chatzopoulou et al., 2010). Οι μεταβολίτες αυτοί μπορεί να είναι τερπενοειδή, αλκαλοειδή, φαινόλες. Ο διαχωρισμός αυτός και η συγκεκριμένη ομαδοποίηση έχει να κάνει με το βιοσυνθετικό μονοπάτι το οποίο ακολουθήθηκε για την δημιουργία των προϊόντων (A. Hill & D. Connolly, 2015; Sell, 2003). Γενικότερα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* είναι γνωστά για την σύστασή τους σε αιθέριο έλαιο, καθιστώντας τα ως ενδιαφέροντα για ποικίλες χρήσεις από τον άνθρωπο.

Το αιθέριο έλαιο συντίθεται σε ειδικά κύτταρα του φυτού όπως οι αδενώδεις τρίχες (Bosabalidis & Tsekos, 1982; Liolios et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, οι αδενώδεις αυτές τρίχες φαίνεται να βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα αναπαραγωγικά όργανα του φυτού (άνθη) και στα νεαρά φύλλα, επομένως αυτά τα μέρη του οργανισμού συνήθως προτιμώνται

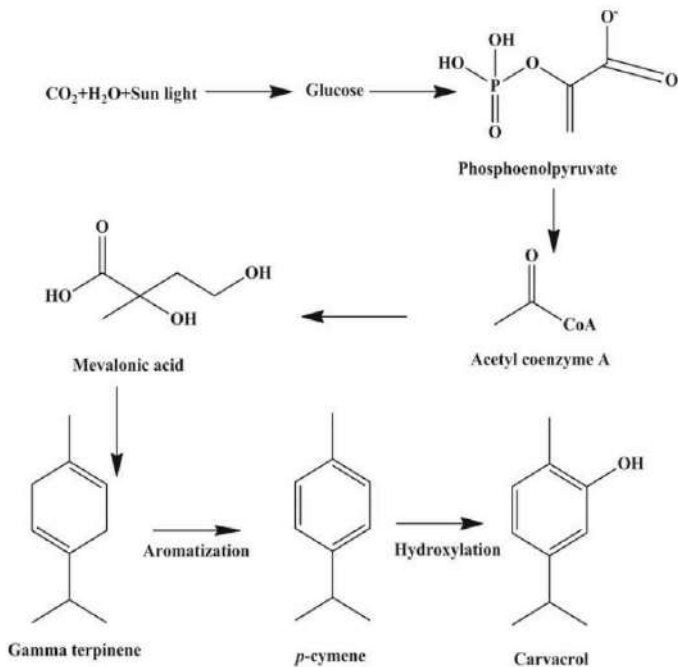
για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου (Kakouri et al., 2022; Werker, 1993). Πρόκειται για αρωματικά, λιπόφιλα μείγματα πτητικών συστατικών, τα οποία χαρακτηρίζονται από γεύση και οσμή και αποτελούνται από διάφορες χημικές ουσίες- δευτερογενείς μεταβολίτες. Υπάρχει μεγάλος αριθμός βιβλιογραφίας σχετικά με τους δευτερογενείς μεταβολίτες του δίκταμου, οι κυριότεροι από τους οποίους συναντώνται συχνά στο γένος *Origanum* αλλά και ευρύτερα στην οικογένεια Lamiaceae. Η καρβακρόλη αναμφισβήτητα είναι η πιο πολύ συζητημένη και πολύ μελετημένη (Bethanis et al., 2013; Carson & Riley, 1995; Daferera et al., 2002; Economakis et al., 1999; Friedman, 2014; Liolios et al., 2009; Mitropoulou et al., 2015; Sivropoulou et al., 1996)

1.2.1. Τερπενοειδή *Origanum dictamnus*

Τα τερπενοειδή (ή αλλιώς ισοπρενοειδή) είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία δομικά και λειτουργικά, στα φυτά (Zhou et al., 2013). Χαρακτηρίζονται από την μονάδα ισοπρενίου (2-μεθυλβουτα-1,3-διένιο) με βάση την οποία δημιουργούνται όλα τα τερπένια. Το ισοπρένιο αποτελείται από 5 άτομα άνθρακα επομένως τα τερπένια θα είναι σχηματισμένα από άνθρακες σε αριθμό πολλαπλάσιο του 5. Με βάση αυτό τα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή χωρίζονται σε μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια, τετρατερπένια, πολυτερπένια. Ο ρόλος που μπορεί να έχουν τα τερπενοειδή στην φύση (στα φυτά για παράδειγμα) είναι τριπλής φύσεως: λειτουργικός, αμυντικός και επικοινωνιακός (Sell, 2003).

1.2.2. Βιοσυνθετικό μονοπάτι

Ο τρόπος με τον οποίο κατηγοριοποιούμε του δευτερογενείς μεταβολίτες σε τερπένια, φαινόλες ή αλκαλοειδή είναι ο τρόπος με τον οποίο έχουν συντεθεί, δηλαδή το βιοσυνθετικό τους μονοπάτι. Ένας από τους σημαντικότερους μεταβολίτες που ανευρίσκεται στο φυτό *Origanum dictamnus* αλλά και σε άλλα είδη του γένους *Origanum* είναι η καρβακρόλη. Η καρβακρόλη συντίθεται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος. Αρχικά η γλυκόζη μετατρέπεται σε φωσφοενολοπυρουβικό οξύ, στην συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται και ακετυλιώνεται σε ακετυλοσυνένζυμο Α και μετατρέπεται σε μεβαλονικό οξύ (Mondal et al., 2021). Το μεβαλονικό οξύ στη συνέχεια μετατρέπεται σε γ-τερπινένιο μέσω της γ-τερπινενικής συνθάσης και την κυκλοποίηση του GDP (Geranyl diphosphate). Το Geranyl diphosphate είναι συνήθης πρόδρομη ουσία στα βιοσυνθετικά μονοπάτια πολλών τερπενίων (Khader & Eckl, 2014; Sell, 2003; Zhou et al., 2013). Το γ-τερπινένιο ύστερα από αρωματοποίηση παράγει το *p*-κυμένιο, ενώ η υδροξυλίωση του τελευταίου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή καρβακρόλης (Friedman, 2014; Mondal et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, η καρβακρόλη συντίθεται από την διφωσφατάση του ισοπεντενυλίου (IDP) και το διφωσφορικό



Εικόνα SEQ Εικόνα * ARABIC 4 Βιοσυνθετικό μονοπάτι καρβακρόλης με βάση το μεβαλονικό οξύ (πηγή: Mondal et al., 2021)

1.3. Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους μπορούμε να απομονώσουμε τους δευτερογενείς μεταβολίτες από ένα φυτό. Η πιο συχνή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση πτητικών συστατικών είναι η απόσταξη. Υπάρχουν τρεις τρόποι απόσταξης: η ξηρή απόσταξη (dry distillation), η υδρο-απόσταξη ή υδροδιάχυση (hydrodiffusion). Η υδρο-απόσταξη είναι μια από τις πιο συνήθεις, εύκολες, παραδοσιακές και οικονομικές διαδικασίες. Ακόμη η ξηρή απόσταξη έχει να κάνει με υψηλές θερμοκρασίες και συνίσταται όταν το φυτικό υλικό είναι ξηλώδες. (A. Hill & D. Connolly, 2015) Στην υδρο-απόσταξη λοιπόν, το φυτικό υλικό βρίσκεται σε επαφή με το νερό και θερμαίνεται μέσω ενός θερμομανδύα για την παραγωγή υδρατμών, οι οποίοι θα συν-αποσταχθούν με τα πτητικά συστατικά. Πάνω από την κύρια αυτή συσκευή υπάρχει ο ψυκτήρας που φέρει δυο λάστιχα για την είσοδο και έξοδο του νερού και την συμπύκνωση των υδρατμών. Στην συνέχεια ο υδρατμός και το νερό διαχωρίζονται με την βοήθεια ενός Florentine flask, που τα διαχωρίζει βασιζόμενο στις διαφορετικές τους πυκνότητες κι έτσι παραλαμβάνουμε το αιθέριο έλαιο (Sell, 2003). Η διευκόλυνση και η απλότητα που προσφέρει η μέθοδος της υδρο-απόσταξης ήταν κρίσιμα για την επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου.

1.3.1. Αέρια χρωματογραφία και Φασματομετρία Μαζών

Η ταυτοποίηση συστατικών είναι μια στοιχειώδης διαδικασία για την μελέτη των φυσικών προϊόντων και την μεταβολομική. Η ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για την ταυτοποίηση πτητικών συστατικών είναι η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται αέρια κινητή φάση και ως στατική φάση χρησιμοποιείται είτε στήλη με στερεό πληρωτικό υλικό, είτε τριχοειδής στήλη (capillary column). Συχνά υπάρχει στοιβάδα υγρού υψηλού σημείου ζέσεως, ακινητοποιημένου στην επιφάνεια του αδρανούς στερεού υποστρώματος. Πάνω από αυτήν ρέει αδρανές αέριο (φέρον αέριο) το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Στην περίπτωση αυτή μιλάμε για χρωματογραφία αέριου-υγρού. Η διαδικασία αυτή είναι περιοριστική, με την έννοια του ότι είναι κατάλληλη μόνο για την ανάλυση πτητικών συστατικών (όπως αρώματα). Το δείγμα εισάγεται στον εισαγωγέα, όπου εξατμίζεται ταχύτατα και εισάγεται σε χρωματογραφική στήλη (στατική φάση) καθώς παρασύρεται από το αδρανές φέρον αέριο (κινητή φάση). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή του αναλύτη μεταξύ αέριας κινητής και υγρής ή στερεής στατικής φάσης. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και για αυτό το λόγο η στήλη είναι εγκλεισμένη σε φούρνο (Adams, 2007; Heftmann, 2004). Με την αέρια χρωματογραφία γίνεται ο διαχωρισμός των πτητικών συστατικών σύμφωνα με την πολικότητά τους και με την Φασματομετρία μαζών η ταυτοποίηση μέσω του φάσματος που δίνει η κάθε ουσία ανάλογα με την μοριακή της μάζα, όταν συγκριθεί με βάσεις δεδομένων από βιβλιοθήκες, όπου είναι καταγεγραμμένα διάφορα φάσματα μαζών (Kim & Zhang, 2015; Stashenko et al., 2010). Το φάσμα μαζών είναι ένα μοριακό αποτύπωμα που χρησιμοποιείται λοιπόν για την ταυτοποίηση ουσιών (Heftmann, 2004).

1.4. Αντιμικροβιακή ιδιότητα

Αιθέρια έλαια από διάφορα φυτά έχουν αποδείξει την αντιμικροβιακή τους ικανότητα έναντι διάφορων παθογόνων βακτηρίων, μυκήτων, εντόμων (Sivropoulou et al., 1996). Ανάμεσά τους είναι και διάφορα είδη του γένους *Origanum* (Sivropoulou et al., 1996). Η ποικιλομορφία των χημικών συστατικών που περιέχονται σε κάθε φυτό είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει και την αντιμικροβιακή του ιδιότητα (Sivropoulou et al., 1996). Το γεγονός ότι είναι βρώσιμα φυτά αποτελεί ιδιαίτερα ενδιαφέροντα παράγοντα εφόσον μπορούμε να οδηγηθούμε σε αντιμικροβιακά προϊόντα φυσικής προέλευσης με πολύ μικρό βαθμό επικινδυνότητας (Mitropoulou et al., 2015). Η συνεχής αναζήτηση για περισσότερο φυσικούς τρόπους στην αντιμετώπιση των μικροβίων τόσο για ασθένειες του ανθρώπου όσο και για την διασφάλιση σωστών υγειονομικών συνθηκών όσον αφορά τον τομέα των τροφίμων μας οδηγεί στο να εξετάσουμε διάφορα ενδεχόμενα με πιο «πράσινο» και «βιώσιμο» προσανατολισμό (Thielmann et al., 2019). Ένα από αυτά είναι η χρήση φυτικών ειδών στην

καταπολέμηση των μικροβίων. Μικροοργανισμοί όπως ο *Staphylococcus aureus*, η *Escherichia coli*, η *Pseudomonas fluorescens* και ο *Bacillus subtilis* είναι συνήθη παθογόνα και αλλοιογόνα βακτήρια. Υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία που αναφέρει την αντιμικροβιακή ιδιότητα του δίκταμου και ειδικότερα ενός κυρίου συστατικού του, της καρβακρόλης έναντι κατά Gram θετικών και αρνητικών μικροβίων (Mitropoulou et al., 2015; Sivropoulou et al., 1996; Thielmann et al., 2019). Τα παραπάνω βακτήρια ανήκουν και στις δυο κατηγορίες Gram για αυτόν τον λόγο και εξετάστηκαν στην συγκεκριμένη εργασία.

1.4.1. Δράση εναντίον ορισμένων παθογόνων

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι με τις οποίες έχει εξεταστεί η αντιμικροβιακή ιδιότητα των αιθέριων ελαίων έναντι παθογόνων, είτε αυτό σημαίνει ότι χρησιμοποιήθηκε το έλαιο αυτούσιο, είτε ότι εξετάστηκαν ξεχωριστά τα κύρια συστατικά του (Thielmann et al., 2019).

Η αντιμικροβιακή δράση των ουσιών διακρίνεται σε:

α) Αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών (βακτηριοστατική, μυκοστατική ή γενικώς μικροβιοστατική δράση) δηλαδή σταματάει την περαιτέρω αύξηση των μικροοργανισμών χωρίς να προκαλεί ουσιαστική μείωση στον πληθυσμό τους. Αυτό συμβαίνει συνήθως λόγω αναστολής της δράσης διάφορων ενζύμων του μεταβολισμού.

β) Βακτηριοκτόνα δράση, δηλαδή εκτός από στάση των μικροοργανισμών έχουμε και μείωση του πληθυσμού τους .

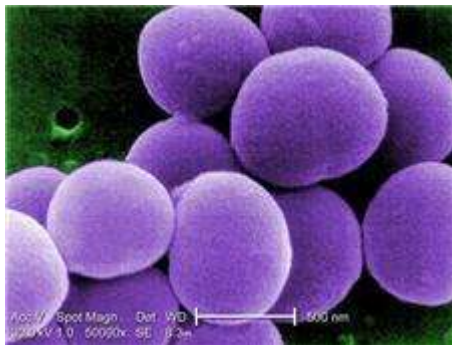
Σε πολλές περιπτώσεις χρειάζεται η αντιμικροβιακή ιδιότητα διαφόρων ουσιών (όπως τα αιθέρια έλαια) να μπορεί να μετρηθεί συγκριτικά. Για τον παραπάνω λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι από τις οποίες η πιο συχνά εκτελούμενη είναι αυτή της μέτρησης ζωνών αναστολής. Η μέτρηση αυτή μας δίνει τόσο ποιοτικά όσο και μερικώς ποσοτικά αποτελέσματα όσον αφορά την αναστολή. (Janssen et al., 1987)

1.4.2. Παρουσίαση μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα ήταν τα εξής στελέχη: οι *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* και *Pseudomonas fluorescens*.

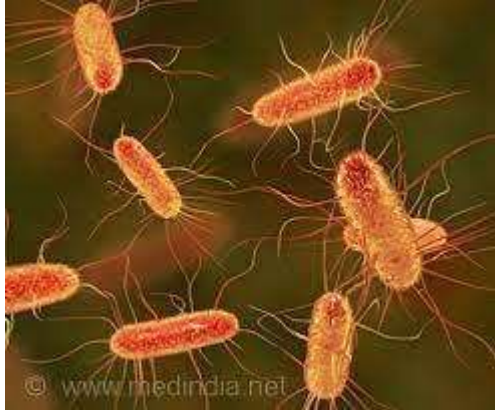
Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήσαμε ήταν δυο θετικοί κατά Gram και δυο αρνητικοί κατά Gram. Θετικοί κατά Gram ήταν οι: *Staphylococcus aureus* B134 & *Bacillus subtilis* B109, ενώ κατά Gram αρνητικοί ήταν οι: *Escherichia coli* B16 & *Pseudomonas fluorescens* B29. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί είναι κάποιοι από τους ευρέως διαδεδομένους για την πραγματοποίηση τέτοιων πειραμάτων (Sivropoulou et al., 1996).

Staphylococcus aureus → Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι σφαιρικό, θετικό κατά Gram. Το βρίσκουμε κυρίως στο δέρμα και την ρινική κοιλότητα των ανθρώπων και μπορεί να προκαλέσει ένα εύρος μολύνσεων, από μέτριες δερματοπάθειες ως πολύ σοβαρές ασθένειες όπως πνευμονία, μηνιγγίτιδα και σήψη (Foster et al., 2014).



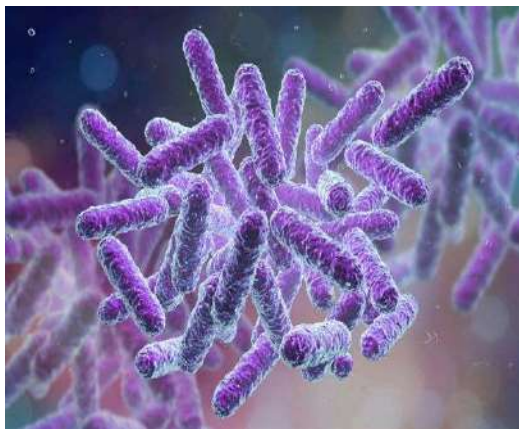
Εικόνα 5 *Staphylococcus aureus* (πηγή: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=11155>)

Escherichia coli → Η *Escherichia coli* είναι ένα από πιο κοινά αρνητικά κατά Gram βακτήρια που κατοικούν στο γαστρεντερικό σύστημα των ανθρώπων και άλλων θερμόαιμων ζώων ενώ είναι ταυτόχρονα και ένα από πιο σημαντικά παθογόνα (Allocati et al., 2013). Συνήθως ζει στο έντερο των ανθρώπων και άλλων ζώων συμβιωτικά χωρίς να προκαλεί παθογένειες όμως παρόλα αυτά προκαλεί ένα ευρύ φάσμα ασθενειών. Είναι ένα ραβδόμορφο αναερόβιο βακτήριο το οποίο κινείται με μαστίγια (Bernhardt & de Boer, 2005).



Εικόνα 6 Escherichia coli (πηγή: <https://www.medindia.net/patientinfo/e-coli-infection.htm>)

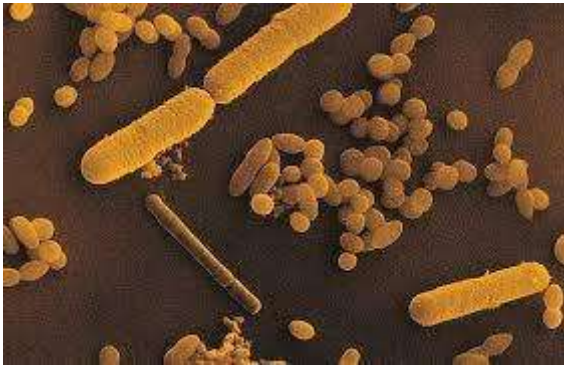
Bacillus subtilis → Το *Bacillus subtilis* είναι ένα ραβδόμορφο, θετικό κατά Gram βακτήριο που το βρίσκουμε στο έδαφος και σε άλλα φυσικά περιβάλλοντα και χρησιμοποιείται συχνά ως οργανισμός μοντέλο στην μικροβιολογία. Ο βάκιλος αυτός είναι ικανός να παράγει ενδοσπόρια, ειδικές διαμορφώσεις που το βοηθούν να επιβιώσει σε δυσμενείς συνθήκες, παραμένοντας αδρανές, ενώ αναγεννάται όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες (Higgins & Dworkin, 2012).



Εικόνα 7 *Bacillus subtilis* (πηγή: <https://microbz.co.uk/bacillus-subtilis/>)

Pseudomonas fluorescens → Γενικότερα τα είδη του γένους *Pseudomonas* είναι παθογόνα ως επί το πλείστον και αποτελούν κίνδυνο για τον άνθρωπο και τα τρόφιμα που αυτός καταναλώνει. Το βακτήριο *P. fluorescens* είναι ένας μονοκύτταρο ραβδόμορφος βάκιλος με μακρύ ίσιο ή καμπυλωτό άξονα, το οποίο κινείται με μαστίγια και είναι αρνητικό κατά Gram. (Kumar et al., 2019). Συνήθως δεν είναι παθογόνο για τον άνθρωπο, όμως τελευταία έχει απομονωθεί και από ανθρώπινα κύτταρα καθώς το θερμοκρασιακό του εύρος έχει αλλάξει.

Φαίνεται να έχει ευρύ φάσμα θερμοκρασιών στις οποίες αναπτύσσεται όμως θεωρείται ψυχρόφιλο καθώς αναπτύσσεται άριστα σε θερμοκρασίες περίπου των 25°C και επιβιώνει μέχρι και σε συνθήκες κατάψυξης. Έχει την δυνατότητα να αλλοιώνει τρόφιμα τόσο εκτός όσο και εντός κατάψυξης και δημιουργεί βιοφίλμ, το οποίο το καθιστά ικανό να σχηματίζει ανθεκτικές αποικίες σε διάφορες επιφάνειες (Scales et al., 2014) (είτε είναι επιφάνειες υλικών, είτε τρόφιμα, είτε ακόμα και το δέρμα των θηλαστικών) και έτσι αυτομάτως αποτελεί κίνδυνο για την βιομηχανία τροφίμων και τον άνθρωπο (Kumar et al., 2019). Τα βιοφίλμ είναι πολύπλοκες, τρισδιάστατες αποικίες μικροοργανισμών που προσκολλώνται σε επιφάνειες και υπάρχουν σε ένα μείγμα- μήτρα από εξωκυτταρικές παραγόμενες πολυμερικές ουσίες, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και DNA. Με αυτόν τον τρόπο είναι προστατευμένα από εξωτερικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες και κατά συνέπεια πιο ανθεκτικά (Scales et al., 2014).



Εικόνα 8 *Pseudomonas fluorescens* (πηγή: <https://www.flinnsci.com/bacterial-cultures-pseudomonas-fluorescens/lm1009/>)

1.4.3. Χρήσεις & Εφαρμογές (τροφήμα, γεωργία, υγεία, φαρμακολογία)

Η φυτοθεραπεία έχει υπάρξει σημαντικό κομμάτι στην παραδοσιακή ιατρική ανά τους αιώνες και αυτό ενισχύεται σήμερα με τις τεχνικές που διαθέτει η επιστήμη στην δοκιμή και απόδειξη ορισμένων ιδιοτήτων. Στα πλαίσια αυτά και οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές. Αρχικά, είδη της οικογένειας Lamiaceae στην οποία ανήκει ο δίκταμος φαίνεται να έχουν χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς όπως: γαστρεντερολογικά προβλήματα (διάρροια, στομαχικοί πόνοι, έλκη κ.α.), αναπνευστικές δυσλειτουργίες, προβλήματα του ουροποιητικού (Beltrán & Esteban, 2016). Οι χρήσεις αυτές φαίνεται να έχουν στην βάση τους την ισχυρή αντιμικροβιακή ιδιότητα που παρατηρείται γενικά στο γένος *Origanum* (Daferera et al., 2002; Janssen et al., 1987; Mitropoulou et al., 2015; Sivropoulou et al., 1996). Η ιδιότητα έναντι των θετικών και αρνητικών κατά Gram μικροβίων (Beltrán & Esteban, 2016; Liolios et al., 2009) οφείλεται στην λιπόφιλη φύση του αιθέριου ελαίου. Τα περισσότερα λιπόφιλα ή αλλιώς υδρόφοβα μόρια συνήθως βλάπτουν τις κυτταρικές μεμβράνες και το να στοχεύουμε στην κυτταρική μεμβράνη είναι ένα από τα βασικότερα όπλα που διαθέτουμε ενάντια στα βακτήρια (Mondal et al., 2021). Η δράση των αντιμικροβιακών παραγόντων όπως τα αιθέρια έλαια προκαλεί αλλαγές στην φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών, αλλάζοντας κατ' επέκταση την σύσταση και την σταθερότητα της μεμβράνης, ενώ επηρεάζεται και η ροή διάφορων ιόντων μέσω της μεμβράνης (Mondal et al., 2021). Έτσι τα βακτηριακά κύτταρα οδηγούνται σε λύση και με τον τρόπο αυτό δρουν συνήθως τέτοιου είδους λιπόφιλα μόρια έναντι παθογόνων (Beltrán & Esteban, 2016; Mondal et al., 2021).

Ακόμη, έχουμε διάφορες εφαρμογές τόσο του φυτού όσο και του αιθέριου ελαίου του, κυρίως λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς του σε καρβακρόλη. Η καρβακρόλη δρα ως ανοσορρυθμιστικός παράγοντας, ως αντιφλεγμονώδες, αντικό, αντιβακτηριδιακό και αντικαρκινικό (Javed et al., 2021; Mondal et al., 2021). Σύμφωνα με την προαναφερθείσα βιβλιογραφία, η καρβακρόλη όταν χορηγήθηκε σε μολυσμένα από κορονοϊό (SARS-CoV-2) κύτταρα, φάνηκε να ενεργοποιεί τα μακροφάγα κύτταρα της ανοσοαπόκρισης και να προκαλεί αναστολή των παραγόντων TNF- α , IL- β και NO, που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και την αντιφλεγμονώδη δράση. Ακόμη, σε πειραματόζωα βρέθηκε ότι η καρβακρόλη ρύθμιζε τα επίπεδα προ και αντί φλεγμονωδών κυτοκινών και λειτούργησε ως γενικός ενισχυτής της ανοσοαπόκρισης. Η αντιοξειδωτική της ικανότητα έχει αποδειχθεί από διάφορες εργασίες ενώ υπάρχουν μελέτες όπου εξετάζεται η αντικαρκινική του δράση. Για παράδειγμα η καρβακρόλη έχει δείξει κυτοτοξικές ιδιότητες έναντι διαφόρων κυτταρικών σειρών με καρκινώματα, προκαλώντας απόπτωση μέσω διαφόρων πρωτεϊνών που επηρεάζει οι οποίες είναι μέρη του μονοπατιού απόπτωσης (Mondal et al., 2021).

2. Πειραματική διαδικασία- Υλικά & Μέθοδοι



2.1. Προμήθεια φυτικού υλικού

Για το πειραματικό κομμάτι της εργασίας χρειάστηκε να συλλεχθεί φυτικό υλικό. Καθώς στην εργασία συγκρίνουμε τον άγριο δίκταμο με τον καλλιεργούμενο, έπρεπε να έχουμε δύο πηγές φυτικού υλικού. Όσον αφορά το άγριο, συλλέχθηκε από τον Ψηλορείτη (εικ.3), στην Κρήτη, αρχές Σεπτέμβρη 2022. Σύμφωνα και με την βιβλιογραφία (Fragaki E.K., 1969; Liolios et al., 2010; Martínez-Francés et al., 2015) υπάρχουν τρεις κύριες εποχές συλλογής δίκταμου. Η μια είναι τέλη Μαΐου, η δεύτερη είναι μετά τις 20 Ιουλίου, όποτε και θεωρείται ότι το φυτό έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο και η τρίτη είναι τέλη Αυγούστου με αρχές Σεπτεμβρίου.



2.1.1.Περιοχή

Η περιοχή από την οποία συλλέχθηκε το φυτικό υλικό βρίσκεται στο όρος Ψηλορείτη στην Κρήτη λίγα χιλιόμετρα μετά τα Ανώγεια. Ο Ψηλορείτης εκτός του ότι είναι το μεγαλύτερο σε υψόμετρο βουνό της Κρήτης, αποτελεί σημαντικό γεωπάρκο και περιοχή Natura 2000 με τεράστια περιβαλλοντολογική ποικιλότητα και πλούτο. Καλύπτει μια περιοχή των 1100 τετραγωνικών χιλιομέτρων και η γεωλογική ιστορία και ιδιομορφία του όρους το καθιστά ιδανικό για την ύπαρξη ενδημικών ειδών (Fassoulas et al., 2012). Ενδημικό είδος είναι και το *Origanum dictamnus*. Σε υψόμετρο 1400μ. βρέθηκαν διάσπαρτοι πληθυσμοί του φυτού *Origanum dictamnus* σε άνθηση με κυρίως νοτιοανατολικό προσανατολισμό. Η ανάβαση και η συλλογή ήταν απαιτητικές διαδικασίες καθώς το είδος προτιμά να βλαστάνει σε απόκρημνα βράχια

ασβεστόλιθου και μάλιστα όσο πιο κρυμμένο γίνεται στις σχισμές των βράχων. Αυτό συμβαίνει διότι είναι από τις αγαπημένες τροφές των ζώων της περιοχής, ιδιαιτέρως των αιγών, με αποτέλεσμα να μην το βρίσκουμε σε μέρη εύκολα προσβάσιμα από ένα ζώο. Συνάμα, η συλλογή από τους ντόπιους καθιστά ακόμη πιο δύσκολη την εύρεση του φυτού σε μεγάλη ποσότητα. Για τον λόγο αυτό η συλλογή έγινε με πολύ προσοχή, από πολλά διαφορετικά φυτά της εγγύς περιοχής ώστε να μην επηρεαστεί η ανάπτυξή τους. συλλέχθηκαν 90gr φυτικού υλικού, τα οποία και αφήσαμε να ξηραθούν σε σκιερό, δροσερό μέρος για ένα μήνα. Μετά την ξήρανση η ξηρή φυτική μάζα ήταν μόλις 34,22 gr.

Όσον αφορά το καλλιεργούμενο δείγμα μας, αυτό ήταν δωρεά από έναν τοπικό παραγωγό της Κρήτης (Creta Votanica IKE, Herbs & Oils). Ο παραγωγός αυτός διατηρεί βιολογικές καλλιέργειες με ελεγχόμενη άρδευση και λίπανση, του *Origanum dictamnus* και άλλων αρωματικών φυτών στην Σητεία, στον Νομό Λασιθίου. Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την εργασία ήταν ήδη αποξηραμένο και ζύγιζε 100gr.

2.2. Υδρο-απόσταξη

Η παραλαβή των πτητικών ουσιών έγινε με την διαδικασία της υδρο-απόσταξης. Μετα το καθάρισμα του φυτικού υλικού, το προσθέσαμε στην σφαιρική φιάλη και προσθέσαμε απεσταγμένο νερό έως την κάλυψη του φυτικού υλικού. Η διάρκεια της υδρο-απόσταξης ήταν 4 ώρες και στο αιθέριο έλαιο που παραλήφθηκε και στις δύο περιπτώσεις προστέθηκε άνυδρο θειικό μαγνήσιο για την απομάκρυνση της υγρασίας. Είναι αδρανές και αποτελεσματικό κάτω από τους 30°C (Vogel, 1989). Στην συνέχεια τα δείγματα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -18°C έως την ανάλυση του.



2.3. GC-MS

Συνήθως χρησιμοποιούμε την συγκεκριμένη μέθοδο ανάλυσης για την εύρεση της σύστασης ενός δείγματος, το οποίο περιέχει πτητικά συστατικά. Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου έγιναν (χρησιμοποιώντας χρόνους κράτησης και βιβλιογραφική συσχέτιση καθώς και βιβλιοθήκες για την ταυτοποίηση) και φασματομετρικές μεθόδους (Φασματομετρία Μαζών, με την οποία το φάσμα μαζών κάθε ουσίας αναλύθηκε, συγκρίθηκε με φάσματα από βιβλιοθήκες και βάσεις δεδομένων).

Πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στο GC ήταν απαραίτητη η αραιώση τους με διαιθυλαιθέρα. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα κυκλοεξανόνης με συγκέντρωση 2mg/ml. Για την Παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν 10ml από το στοκ διάλυμα,

τα οποία διαλύθηκαν σε 990μl ακετόνης. Στην συνέχεια το δείγμα προς ανάλυση αραιώθηκε με διαιθυλαιθέρα (1:10 v/v) ,εισάγοντας σε φιαλίδιο 100μl δείγματος, 890μl διαιθυλαιθέρα και 10μl κυκλοεξανόνης.

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν συζευγμένος με φασματόμετρο μαζών, 436-GC/ Brucker. Φέρει αυτόματο δειγματολήπτη CP-8400. Η αναλυτική τριχοειδής στήλη ήταν Rxi- 5Sil ms, 30m x 0.25mm, id 0.25μm. Το φέρον αέριο ήταν το Ήλιο (He) με ταχύτητα ροής 1,0ml/min. Η θερμοκρασία στον εισαγωγέα ήταν 220°C ενώ το πρόγραμμα ανάλυσης που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: Αρχική θερμοκρασία 60°C και τελική θερμοκρασία 220°C με ρυθμό 3°C ανά λεπτό και διάρκεια 53,33 λεπτά. Η ποσότητα του δείγματος που εισάχθηκε στον δειγματολήπτη ήταν 1μl.

Όσον αφορά το φασματόμετρο μαζών (MS), η θερμοκρασία ιονισμού ήταν 230°C και η λειτουργία πηγής ιονισμού ήταν στα 70eV και το εύρος μαζών ήταν 45-400 m/z .

2.4. Πειράματα για αντιμικροβιακή δράση

Πίνακας 2: Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν

Θετικοί κατά Gram (+)	Αρνητικοί κατά Gram (-)
Staphylococcus aureus (B134)	E.Coli (B16)
Bacillus subtilis (B109)	Pseudomonas fluorescens (B29)

Για να αξιολογήσουμε εάν το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum dictamnus* έχει αντιμικροβιακή δραστηριότητα και κατά πόσο αυτή διαφέρει μεταξύ άγριου και καλλιεργούμενου τύπου κάναμε πείραμα με την μέθοδο διάχυσης σε θρεπτικό υλικό.

Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ιδιότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροαραίωσης σε θρεπτικό ζωμό (Broth Micro dilution Method). Η μικροαραίωση σε ζωμό είναι μια από τις βασικότερες μεθόδους δοκιμής της ευαισθησίας κατά των μικροοργανισμών και είναι μια απλή, οικονομική και επαναλήψιμη διαδικασία (Mitropoulou et al., 2015).

Τα μικροβιακά στελέχη προήλθαν από την συλλογή απομονωθέντων βακτηριών στελεχών που διατηρεί το Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΜΒΤ). Οι μικροοργανισμοί συντηρούνται στους -20°C σε Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου. Η πειραματική διαδικασία και οι διάφοροι χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν, έγιναν πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες ενώ για λόγους σωστής αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, αυτά πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Tryptone Soy Broth (15g/500ml απιονισμένο νερό, ήπια ανάδευση και καθόλου θέρμανση)
- Tryptone Soy Broth Double Strength (15g/250ml απιονισμένο νερό, ήπια ανάδευση και καθόλου θέρμανση)
- Σωληνάκια με 10ml Tryptone Soy Broth
- Tryptone Soy Agar για streaking & spreading.
- Ringer Solution (2 ταμπλέτες/1 λίτρο απιονισμένο νερό)
- Σωληνάκια με 9ml Ringer Solution



Ανανέωση μικροοργανισμών

Αρχικά, έγινε η προετοιμασία των τριβλίων που θα χρησιμοποιούνταν στο πείραμα. Για τον λόγο αυτό έγινε χρήση της τεχνικής της γραμμικής επίστρωσης σε τριβλία με TSA θρεπτικό υλικό, με 2 επαναλήψεις για κάθε μικροοργανισμό, με σκοπό τον σχηματισμό μεμονωμένων αποικιών του βακτηρίου και επώαση στις ίδιες συνθήκες με τα σωληνάκια της πρώτης ανανέωσης, την οποία θα περιγράψουμε αμέσως παρακάτω. Για να βεβαιωθούμε ότι τα μικρόβια ήταν ζωντανά, πραγματοποιήθηκε η ανανέωσή τους πριν τον εμβολιασμό σε

υπόστρωμα. Η ανανέωση διαρκεί 18-24 ώρες, με ακόλουθη επώαση σε θερμοκρασία 37°C. Πριν τον ενοφθαλμισμό γίνονται πάντα δύο ανανεώσεις προς επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων όσον αφορά την ζωτικότητα. Στον πίνακα βλέπουμε τις συνθήκες επώασης για το κάθε στέλεχος με το οποίο δουλέψαμε στο εργαστήριο.

Έγιναν δυο διαδοχικές ανανεώσεις:

Στην πρώτη, έγινε λήψη 100ml κυττάρων από το stock και προσθήκη τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10ml TSB και εν συνεχεία επώαση στις κατάλληλες συνθήκες και χρόνους για τον κάθε μικροοργανισμό. Μετα την πρώτη ανανέωση ο αριθμός των κυττάρων των μικροοργανισμών αναμένεται μεταξύ 10^8 και 10^9 CFU/ml.

Η δεύτερη ανανέωση περιλάμβανε την μεταφορά 100ml από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10ml TSB και στη συνέχεια επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες. Μετα την 2^η ανανέωση, ο αριθμός των κυττάρων του μικροοργανισμού αναμένονταν μεταξύ 10^7 και 10^6 CFU/ml. Για τον καθαρισμό του εμβολίου έγινε φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές (rpm) για 10 min στους 4°C και στην συνέχεια, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10ml ισοτονικού διαλύματος ¼ strength Ringer's solution (2 φορές). Ο καθαρισμός του εμβολίου είχε ως σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μικροβιακών μεταβολιτών που υφίστανται στο μέσο. Μετα την δεύτερη ανανέωση γίνονται δυο με τρεις διαδοχικές αραιώσεις έως ότου καταλήξουμε στον επιθυμητό αριθμό αποικιών/ ml (10^4 CFU/ml). Η επιβεβαίωση της συγκέντρωσης του αρχικού εμβολίου γίνονταν με καταμέτρηση των αποικιών σε τριβλία TSA.

Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Στην συνέχεια ακολούθησε η αραιώση των μικροοργανισμών σε Ringer solution. Αρχικά στο αποστειρωμένο falcon με το καθαρό εμβόλιο, προστίθενται 10ml Ringer solution και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια διενεργούνται οι διαδοχικές αραιώσεις με την μεταφορά 1ml αναδευμένου περιεχομένου κυττάρων του μικροοργανισμού και Ringer solution σε νέα σωληνάκια των 9ml Ringer. Τέλος πραγματοποιείται δειγματοληψία των διαδοχικών

Μικροοργανισμοί	Θερμοκρασία επώασης (°C)	Χρόνος επώασης (h)
<i>E.coli</i> B16	37	24
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B29	25	48
<i>Staphylococcus aureus</i> B134	37	24
<i>Bacillus subtilis</i> B109	30-35	24-48

αραιώσεων του τελικού εμβολίου (μηδενική αραιώση, αραιώση -1, αραιώση -2, αραιώση -3) σε νέα σωληνάκια των 9ml Ringer για την εξακρίβωση του αρχικού πληθυσμού του κάθε οργανισμού με την τεχνική της επίστρωσης (spread plating) σε τριβλία υποστρώματος TSA και την επώαση αυτών στους 37 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες. Την επομένη, έγινε η καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών.

Μέτρηση ζωνών αναστολής και Well- Diffusion Assay

Για να μελετήσουμε κατά πόσο το αιθέριο έλαιο τόσο του άγριου όσο και του καλλιεργούμενου δίκταμου έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες χρησιμοποιούμε συνήθως την μέθοδο της μέτρησης ζωνών αναστολής (Liolios et al., 2009; Mitropoulou et al., 2015).

Σε τριβλία με κατάλληλο πλούσιο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα κοινής χρήσης επιστρώνουμε 0,1ml εναιωρήματος καθαρής καλλιέργειας από τον μικροοργανισμό-στόχο και έπειτα ανοίγουμε μια τρύπα-πηγαδάκι (well) όπου θα τοποθετήσουμε ποσότητα της αντιμικροβιακής ουσίας, στην περίπτωση μας το αιθέριο έλαιο. Τα πηγαδάκια εμβολιάστηκαν με ποσότητα 20μl αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενου δίκταμου και 20 μl αιθέριου ελαίου άγριου δίκταμου και στη συνέχεια τα τριβλία επωάστηκαν στις κατάλληλες συνθήκες για τον κάθε μικροοργανισμό ώστε να μπορέσουμε να μετρήσουμε τις ζώνες αναστολής, δηλαδή τα mm της διαμέτρου της ζώνης πέρα από το άκρο του πηγαδιού (βοθρίου) στην οποία δεν παρατηρείται εξάπλωση των αποικιών του μικροοργανισμού. Η αντιμικροβιακή ουσία διαχέεται μέσω του βοθρίου στο θρεπτικό υλικό γύρω από το βοθρίο και προς το υπόλοιπο υπόστρωμα. Σύμφωνα και με άλλες εργασίες (Friedman et al., 2002; Jorgensen & Ferraro, 2009) γαλακτωματοποιητές και οργανικοί διαλύτες αποφεύχθηκαν για περαιτέρω αραιώση του αιθέριου ελαίου καθώς πιστεύεται ότι μειώνουν την ευαισθησία του πειράματος έναντι των μικροβίων. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου με τα πηγαδάκια (well diffusion test) είναι η απλότητα, το γεγονός ότι δεν χρειάζεται ειδικό εξοπλισμό, η εξοικονόμηση χρόνου και χρημάτων και η ιδιότητα της μεθόδου να παράγει αποτελέσματα με κατηγορική φύση (δηλαδή ποιοτικό αποτέλεσμα για το αν δρα ή όχι το αιθέριο έλαιο ως αντιμικροβιακό). Ακόμη η ευελιξία που μπορεί να έχει ο κάθε ερευνητής στο πως θα οργανώσει το πείραμά του (Jorgensen & Ferraro, 2009)

Για το αιθέριο έλαιο *Origanum dictamnus* δημιουργήσαμε 16 τριβλία, οχτώ για κάθε ένα από τα δυο δείγματα αιθέριου ελαίου που είχαμε (άγριο και καλλιεργούμενο, W και C αντίστοιχα) και 2 για κάθε μικροοργανισμό που είχαμε να μελετήσουμε για λόγους επαναληψιμότητας. Επομένως είχαμε τα παρακάτω τριβλία :

Πίνακας 2 Αρίθμηση τριβλίων για το πείραμα

Cultivated (C) and Wild (W) <i>Origanum dictamnus</i> essential oil (1st trial)	Cultivated (C) and Wild (W) <i>Origanum dictamnus</i> essential oil (2nd trial)
B16 C 1 <i>E. coli</i>	B16 C 2 <i>E. coli</i>
B16 W 1 <i>E. coli</i>	B16 W 2 <i>E. coli</i>
B29 C 1 <i>P. fluorescens</i>	B29 C 2 <i>P. fluorescens</i>
B29 W 1 <i>P. fluorescens</i>	B29 W 2 <i>P. fluorescens</i>
B109 C 1 <i>B.subtilis</i>	B109 C 2 <i>B.subtilis</i>
B109 W 1 <i>B.subtilis</i>	B109 W 2 <i>B.subtilis</i>
B134 C 1 <i>S.aureus</i>	B134 C 2 <i>S.aureus</i>
B134 W 1 <i>S.aureus</i>	B134 W 2 <i>S.aureus</i>

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1. ΥΔΡΟ ΑΠΟΣΤΑΞΗ & ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Όσον αφορά την υδροαπόσταξη και την απόδοση που έδωσαν τα δυο φυτικά υλικά είχαμε ότι:

Άγριος δίκταμος: Ξηρή φυτική μάζα 34,22γρ και αιθέριο έλαιο που προέκυψε ήταν 0,5 ml.

Επομένως είχαμε απόδοση σε ml/100g ξηρού φυτικού υλικού 1.46% v/w

Ο καλλιεργούμενος δίκταμος ζύγιζε ως ξηρή φυτική μάζα 100g και έδωσε αιθέριο έλαιο σε ποσότητα 2,3ml.

Επομένως η απόδοση ήταν 2.3% v/w

Πίνακας 3 Αποδόσεις δειγμάτων σε αιθέριο έλαιο

Δείγμα	Βάρος (g)	Ποσότητα αιθέριου ελαίου (ml)	Απόδοση σε αιθέριο έλαιο (ml/100gr ξ.φ.μ)
O. dictamnus (wild)	34.22	0.5	1.46
O. dictamnus (cultivated)	100	2.3	2.3

Παρατηρούμε ότι η απόδοση του δείγματος του άγριου δίκταμου είναι αισθητά μικρότερη από αυτή του καλλιεργούμενου. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες αλλά κύριο λόγο παίζουν οι κλιματικές και εδαφικές συνθήκες καθώς και η εποχή συλλογής. Η εποχή που συλλέχτηκε το δείγμα από τον Ψηλορείτη ήταν στο τέλος της άνθισης με αποτέλεσμα να υπάρχει ίσως μείωση στην περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο καθώς το φυτό πλησιάζει προς το τέλος της ανθοφορίας. Αντιθέτως το καλλιεργούμενο δείγμα έχει συλλεχθεί πάνω στην ανθοφορία ώστε να υπάρχει η μέγιστη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο καθώς τότε το προϊόν έχει μεγαλύτερη εμπορική αξία. Ακόμη είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η απόδοση του αιθέριου ελαίου έχει δειχθεί ότι μειώνεται όσο αυξάνεται το υψόμετρο και εμείς συλλέξαμε τον άγριο δίκταμο από ένα υψόμετρο γύρω στα 1400μ (Bosabalidis & Tsekos, 1982; Mehalaine & Chenchouni, 2020).

3.2. Αντιμικροβιακά Πειράματα

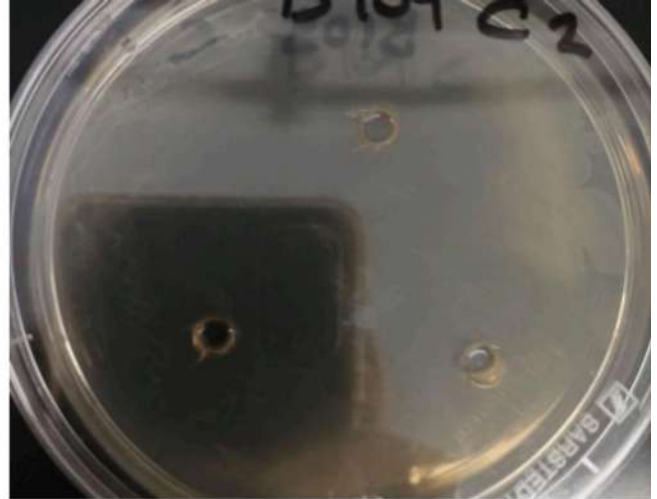
Από τα παραπάνω πειράματα προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα εφόσον αφήσαμε τα τριβλία με τους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν μετά την προσθήκη των αιθέριων ελαίων. Όταν εξετάσαμε τα τριβλία ύστερα από 48h για κάθε είδος μικροοργανισμού:

Bacillus subtilis

Δράση αιθέριου ελαίου καλλιεργούμενου και άγριου δίκταμου στον *Bacillus subtilis*



Bacillus subtilis Cultivated Trial 1 (B109 C1)



Bacillus subtilis Cultivated Trial 2 (B109 C2)

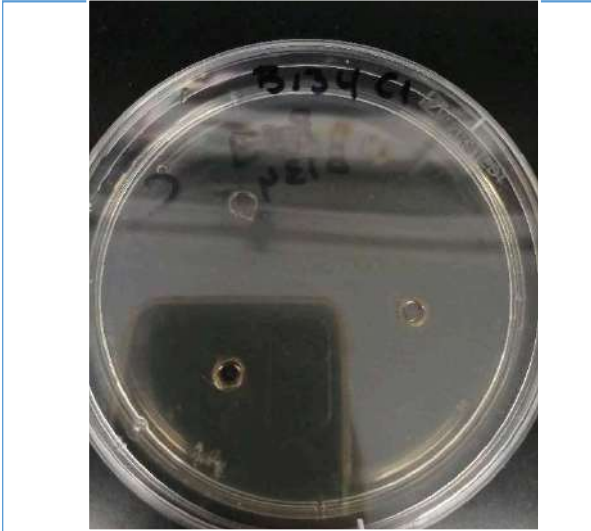


Bacillus subtilis Wild Trial 1 (B109 W1)

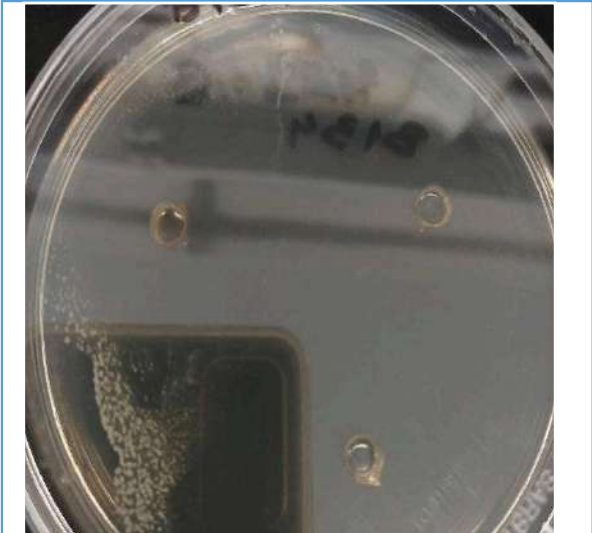


Bacillus subtilis Wild Trial 2 (B109 W2)

Staphylococcus aureus



Staphylococcus aureus Cultivated Trial 1 (B134 C1)



Staphylococcus aureus Cultivated Trial 2 (B134 C2)

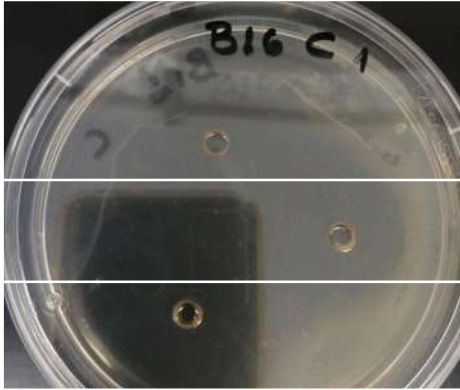


Staphylococcus aureus Wild Trial 1 (B134 W1)

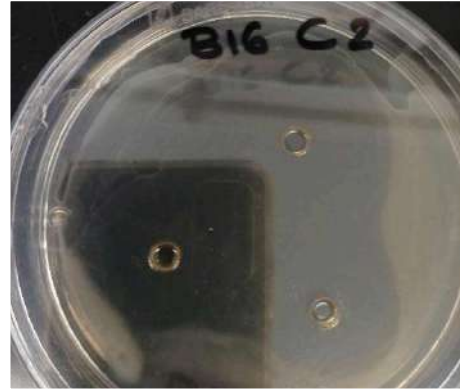


Staphylococcus aureus Wild Trial 2 (B134 W2)

Escherichia coli



Escherichia coli Cultivated Trial 1 (B16 C1)



Escherichia coli Cultivated Trial 2 (B16 C2)

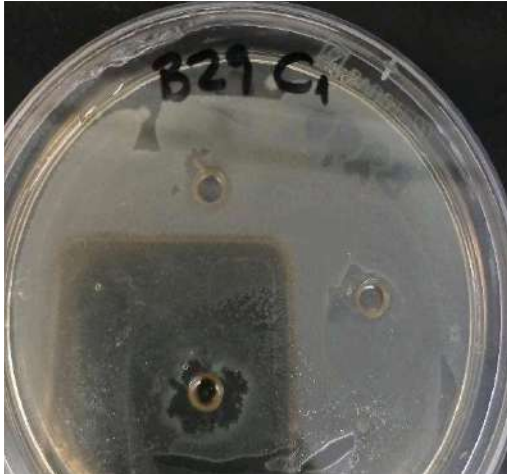


Escherichia coli Wild Trial 1 (B16 W1)



Escherichia coli Wild Trial 2 (B16 W2)

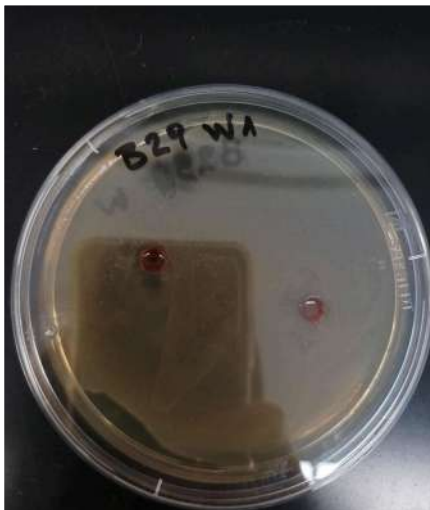
Pseudomonas fluorescens



Pseudomonas fluorescens: Trial 1-->
Cultivated EO (B29 C1)



Pseudomonas fluorescens: Trial 2-->
Cultivated EO (B29 C2)



Pseudomonas fluorescens: Trial 1 -->
Wild EO (B29 W1)

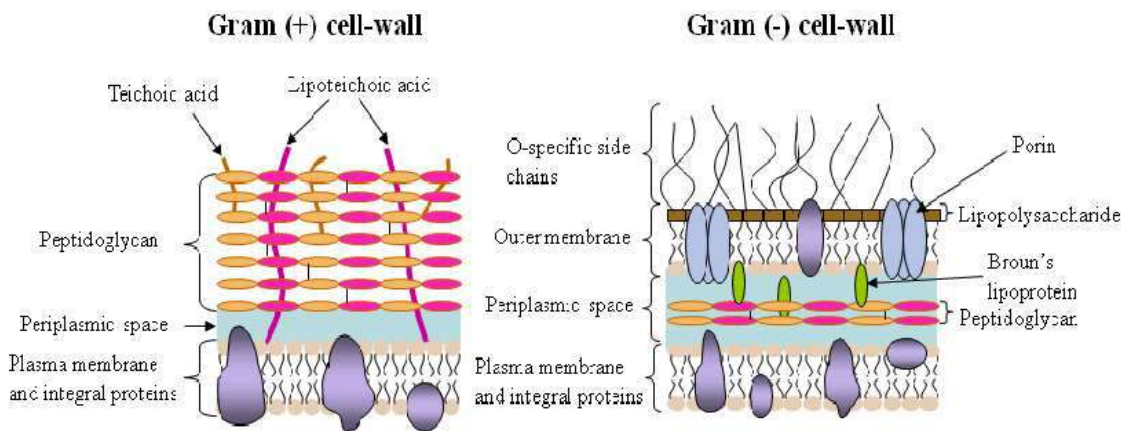


Pseudomonas fluorescens Trial 2 -->
Wild EO (B29 W2)

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ιδιότητας των αιθέριων ελαίων. Η πληθώρα μεθόδων και οι διαφορετικοί ορισμοί της αντιμικροβιακής ιδιότητας δυσκολεύουν την αντικειμενική σύγκριση των αποτελεσμάτων από διάφορες πηγές βιβλιογραφίας (Thielmann et al., 2019). Παρόλα αυτά το αιθέριο έλαιο από διάφορα είδη του γένους *Origanum* και οι ουσίες που περιέχουν σε μεγάλη ποσότητα όπως η καρβακρόλη, η θυμόλη και η κινναμaldeυδή είναι τόσο γνωστές για την αποτελεσματικότητά τους έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που θα μπορούσαν να είναι το μέτρο σύγκρισης για την αντιμικροβιακή ικανότητα άλλων αιθέριων ελαίων (Friedman et al., 2002; Mitropoulou et al., 2015; Mondal et al., 2021; Thielmann et al., 2019). Φυσικά η αντιμικροβιακή ιδιότητα αποδίδεται στην καρβακρόλη διότι πέραν του ότι αποτελεί (μαζί με το *p*-κυμενιο και το *γ*-τερπινένιο που προάγουν την βιοσύνθεσή της) το μεγαλύτερο ποσοστό από τα συστατικά του αιθέριου ελαίου, έχει επίσης αποδειχθεί με *in vitro* πειράματα ότι το *p*-κυμένιο και το *γ*-τερπινένιο δεν έχουν σημαντική αντιμικροβιακή ιδιότητα (Sivropoulou et al., 1996). Επίσης ξέρουμε ότι ο φαινολικός δακτύλιος και το υδροξύλιο που υπάρχουν στην δομή της καρβακρόλης αλληλοεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων προκαλώντας αλλαγές στην διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων και προκαλώντας λύση και έτσι συνεισφέρουν απόλυτα στην αντιμικροβιακή ιδιότητα της (Mondal et al., 2021). Η καρβακρόλη έχει βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνα δράση έναντι διάφορων παθογόνων όπως *Vibrio cholerae*, *Cambylobacter jejuni*, *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *S.aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus sakei*, *Pseudomonas putida*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* (Friedman et al., 2002; Jorgensen & Ferraro, 2009; Mondal et al., 2021). Φυσικά, το ότι έχουμε περισσότερα δεδομένα από εργασίες για την καρβακρόλη δεν σημαίνει ότι είναι η μόνη ουσία στο αιθέριο έλαιο που έχει κάποια βιοδραστικότητα. Διάφορες από τις ουσίες που εμπεριέχονται έχουν συνεργιστική δράση και μαζί αποτελούν ένα μείγμα το οποίο ίσως να είναι πιο αποτελεσματικό από την απομονωμένη κυρίαρχη ουσία (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Πέρα από την καθαρά αντιμικροβιακή ιδιότητα, ουσίες που βρίσκονται στο μείγμα μπορεί να λειτουργούν αθροιστικά ή ακόμα και ανασταλτικά σε παράγοντες που εμποδίζουν την καρβακρόλη να δράσει, καθιστώντας έτσι στην κυρίαρχη ουσία είτε περισσότερη βιοδιαθεσιμότητα είτε μεγαλύτερη απορροφητικότητα (Alam et al., 2022; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009).

Στην περίπτωση μας παρατηρήθηκε μεγάλη αναστολή στην ανάπτυξη των βακτηρίων στις περισσότερες περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα όπως βλέπουμε και στον πίνακα 4, είχαμε μείωση της ανάπτυξης του *Bacillus subtilis* και του *Staphylococcus aureus* ενώ μικρότερη μείωση παρατηρήθηκε στην *Escherichia coli*. Σχεδόν καμία αλλαγή δεν είχαμε στην ανάπτυξη της *Pseudomonas fluorescens*. Αξίζει να σημειωθεί ότι και άλλα είδη του γένους *Pseudomonas* έχουν φανεί ανθεκτικά σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Sivropoulou et al., 1996). Συγκεκριμένα το είδος *Pseudomonas aeruginosa* φάνηκε ανθεκτικό τόσο στην καρβακρόλη, όσο και στην θυμόλη, παρόλα αυτά βρέθηκε να έχει ευαισθησία στην ισοπουλεγόλη, την πουλεγόνη και την πιπεριτόνη (Didry et al., 1993). Φάνηκε ότι το αιθέριο έλαιο δεν είχε κανένα αποτέλεσμα έναντι του συγκεκριμένου παθογόνου. Αυτό ίσως οφείλεται επίσης στο ότι η

Escherichia coli και η *Pseudomonas fluorescens* είναι Gram αρνητικά βακτήρια και αποτελούνται από περισσότερα στρώματα προστασίας στην κυτταρική μεμβράνη τους. Δηλαδή πέρα από τις πεπτιδογλυκάνες που υπάρχουν στα θετικά κατά Gram, εδώ έχουμε και μια επιπλέον εξωτερική μεμβράνη, της οποίας η προστασία δεν αφήνει τα συστατικά του αιθέριου ελαίου να δράσουν (βλ. εικόνα 13). Όπως φαίνεται και στην εικόνα, τα Gram θετικά βακτήρια έχουν κυτταρικό τοίχωμα που περιλαμβάνει μόνο μια λιπιδική πλασματική μεμβράνη ενώ τα Gram αρνητικά έχουν μια εσωτερική και μια εξωτερική κυτταρική μεμβράνη και μόνο ένα μικρό στρώμα πεπτιδογλυκάνης μεταξύ των δυο μεμβρανών. Ακόμη υπάρχει ένα εξωτερικό επίστρωμα από λιποπολυσακχαρίτες LPS, οι οποίοι φαίνεται να έχουν ισχυρό ρόλο στην προστασία του βακτηριδιακού κυττάρου από αντιβακτηριακούς παράγοντες (Atanasova, 2010; Lukáčová et al., 2008). Έχει δειχθεί ότι γενικότερα τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα σε διάφορα αιθέρια έλαια λόγω αυτής της πολυπλοκότητας του τοιχώματός τους (Burt, 2004). Ακόμη, η *Pseudomonas fluorescens* είναι και ψυχρόφιλο βακτήριο. Ίσως σε θερμοκρασίες χαμηλές το αιθέριο έλαιο δεν δρα όπως σε θερμοκρασίες γύρω στους 37 βαθμούς στους οποίους ευδοκούν τα άλλα τρία είδη βακτηρίων.



Εικόνα 13 Σύγκριση θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όσον αφορά το κυτταρικό τους τοίχωμα (πηγή Anatasova 2010)

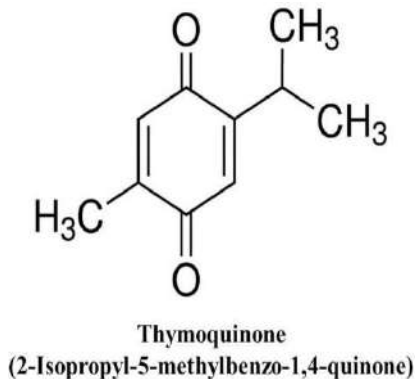
Θα μπορούσαν και άλλοι λόγοι να συντελέσουν στο ότι είδαμε μικρότερη αναστολή στην ανάπτυξη της *Pseudomonas fluorescens* και του *Escherichia coli*. Αλώστε όπως είπαμε και παραπάνω, κάποια είδη του γένους *Pseudomonas* φαίνεται να είναι ανθεκτικά στην καρβακρόλη (Didry et al., 1993). Η εγγενής αυτή ανθεκτικότητα όπως ονομάζεται είναι ένα χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί σε διάφορα βακτήρια και φαίνεται να είναι μια ενδογενής ιδιότητα του οργανισμού να αντιστέκεται σε ορισμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Burt, 2004; Nazzaro et al., 2013). Αυτό μπορεί να οφείλεται και σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας που απέκτησαν ορισμένα βακτήρια μετά από την ανθρωπογενή υπερχρήση ισχυρών αντιβιοτικών (Alam et al., 2022; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009).

Για να εξεταστούν φυσικά όλα αυτά θα πρέπει τα πειράματα να επαναληφθούν με περισσότερα επαναληπτικά trials και με την μέθοδο των αραιώσεων του αιθέριου ελαίου σε κάποιον διαλύτη ώστε να βρούμε την MIC (Minimum Inhibition Concentration) και να είμαστε πιο ακριβείς στην συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου που είναι ανασταλτική στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Ακόμη θα μπορούσαμε να δοκιμάσουμε διάφορα αιθέρια έλαια έναντι της *Pseudomonas fluorescens* ώστε να διαπιστώσουμε σε ποιες ουσίες είναι ανθεκτική και να βρούμε την βαθύτερη αιτία αυτής της ανθεκτικότητας.

Trials	Mean Average of well diameters (mm)
B109 C1	39.94
B109 C2	39.6
B109 W1	46.95
B109 W2	53.8
B134 C1	59.17
B134 C2	45.92
B134 W1	59.34
B134 W2	37.81
B29 C1	10.105
B29 C2	4.625
B29 W1	5.92
B29 W2	8.12
B16 C1	20.8
B16 C2	30.7
B16 W1	19.495
B16 W2	20.22

Πίνακας 4 Μέσος όρος της διαμέτρου αναστολής ανάπτυξης των μικροοργανισμών από τα πηγαδάκια στο θρεπτικό υλικό

3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ



Από την χρωματογραφία και την φασματομετρία μαζών των δειγμάτων μας πήραμε τα αποτελέσματα που φαίνονται τόσο στους πίνακες 5 και 6, όσο και στο παράρτημα με τα διαγράμματα και τα φάσματα MS. Στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκε η χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου του φυτού και μεγάλο ποσοστό των ουσιών ανήκαν στην ομάδα των τερπενοειδών. Όπως και το συγγενικό *Origanum vulgare* και άλλα είδη ρίγανης του γένους *Origanum*, έτσι και εδώ, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, έχουμε υψηλό ποσοστό μονοτερπενίων και οξυγονομένων συστατικών, όπως το γ-τερπινένιο και το p-κυμένιο, η θυμόλη και η καρβακρόλη (Liolios et al., 2009). Είδαμε σαφώς ότι το αιθέριο έλαιο από το άγριο δείγμα είχε παραπάνω ουσίες συγκριτικά με αυτό που προήλθε από το καλλιεργούμενο. Αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της εργασίας των (Economakis et al., 1999). Οι βασικές ουσίες ήταν 39 στο άγριο δείγμα ενώ στο καλλιεργούμενο ήταν 38. Η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε μέσω του προγράμματος επεξεργασίας δεδομένων GC-MS και ταυτόχρονη σύγκριση με την βιβλιοθήκη Adams και NIST (Adams, 2007). Εξαιρετικά ενδιαφέρουσα είναι η παρουσία της θυμοκινόνης μόνο στο άγριο δείγμα, μια ουσία που τα τελευταία χρόνια φαίνεται να παρακινεί το επιστημονικό ενδιαφέρον για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, ηπατοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις) (Badary et al., 2021; Khader & Eckl, 2014). Υπάρχουν λοιπόν διαφορές μεταξύ καλλιεργούμενου και άγριου όσον αφορά την χημική σύσταση. Στο άγριο έχουμε μενθόλη, 3-οκτανόνη, 3-οκτανόλη, trans-πινοκαρβεόλη, cis-διυδρο καρβόνη, trans-διυδρο καρβόνη, trans muurolo-4(14),5-diene, trans cadiña-1(6),4-diene, δ-καδινένιο, θυμουδρο κινόνη και φυσικά Θυμοκινόνη (βλ. Πίνακα 5). Στο καλλιεργούμενο έχουμε β-πινένιο, α-φελανδρενίνη, δ-καρένιο, E-β-οσιμένιο, cis-p-μενθ-2-εν-1-ολη, καρβόνη, καρβακρολμεθυλεθέρα και ο-κυμεν-5-όλη. Οι κύριες ουσίες όμως είναι οι ίδιες ενώ φυσικά ο χημειότυπος θα διαφέρει καθώς τα είδη του γένους *Origanum* αλλά και άλλα γένη της οικογένειας Lamiaceae χαρακτηρίζονται από έντονο χημικό πολυμορφισμό (Beltrán & Esteban, 2016; Daferera et al., 2002; Lianoroulou & Bosabalidis, 2014). Οι ουσίες που είναι κοινές και στα δυο δείγματα και έχουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι : carvacrol, p-cymene, γ-terpinene, terpinene-4-ol, α-pinene, camphene, myrcene, limonene, linalool και sabinene. Ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι στο άγριο παρατηρούμε σε αρκετά υψηλή περιεκτικότητα την μενθόλη, ενώ στο καλλιεργούμενο δεν την παρατηρούμε καθόλου. Η μενθόλη είναι χαρακτηριστική ουσία της οικογένειας Lamiaceae (Sell, 2003). Όσον αφορά τον δίκταμο, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι τα σημαντικότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου του είναι η καρβακρόλη, το γ-τερπινένιο και το p-κυμένιο (Daferera et al., 2002; Economakis et al., 1999; Harvala, 1987; Liolios et al., 2010; Martínez-Francés et al., 2015; Sivropoulou et al., 1996; Skrubis, 1979). Ακόμη σημαντικό ποσοστό του αιθέριου ελαίου καταλαμβάνουν και το α-πινένιο, α-θουγιόνη, καμφένιο, σαμπινένιο, θυμοκινόνη, λιναλοόλη, α-κοπαένιο, D-γερμακρένιο, β-καρβοφυλλένιο κ.ά.

(Daferera et al., 2002; Economakis et al., 1999, 1999; Liolios et al., 2010; Sivropoulou et al., 1996). Το θετικό είναι ότι με τα αποτελέσματα αυτά δείχνουμε ότι δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στην χημική σύσταση του άγριου με τον καλλιεργούμενο δίκταμο (αν και ο καλλιεργούμενος ο συγκεκριμένος φύεται σε εδάφη της Κρήτης, άρα στον τόπο ενδημισμού του) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές. Η σύσταση του εδάφους σαφώς και επηρεάζει την σύσταση του αιθέριου ελαίου (Banchio et al., 2009; Tursun, 2022). Διάφορες έρευνες σε ποικίλα φυτά έχουν δείξει την σχέση μεταξύ σύστασης εδάφους και παραγωγής και ποιότητας αιθέριου ελαίου. Εξάλλου οι περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες το φυτό εκτίθεται ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων του και άρα διαφοροποιούν τον εκάστοτε φαινότυπο και κατ' επέκταση και τον δευτερογενή μεταβολισμό άρα τον χημειότυπο κλπ. (Mehalaine & Chenchouni, 2020). Για παράδειγμα σε μια έρευνα για την σχέση αιθέριου ελαίου βασιλικού με το έδαφος στο οποίο αναπτύσσεται έδειξε ότι υπήρχε διαφορά στην σύσταση του ελαίου όταν αυτό αναπτύσσονταν σε αργιλώδη εδάφη, σε ασβεστολιθικά ή σε αμμώδη. (Tursun, 2022). Μάλιστα έδειξε ότι η αύξηση του ανθρακικού ασβεστίου στον τύπο του εδάφους οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής του αιθέριου ελαίου, κάτι που είναι πολύ σπουδαίο καθώς στην Κρήτη ο δίκταμος ως επί το πλείστον φύεται σε ασβεστολιθικά εδάφη και φυσικά αποτελεί μια κατευθυντήρια πληροφορία για την καλλιέργεια του είδους και εκτός Κρήτης. Δεδομένου της τρωτότητας του είδους και του πόσο σημαντικό είναι να το προστατέψουμε, είναι καλό να προωθήσουμε την καλλιέργειά του και έτσι να προμηθευόμαστε αυτό που χρειαζόμαστε για τις ανάγκες μας από την γεωργία.

Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι υπήρξε μικρή διαφορά μεταξύ των δυο δειγμάτων όσον αφορά τα αιθέρια έλαια, η οποία θα χρειαστεί να μελετηθεί περαιτέρω στο μέλλον. Αυτό μπορεί να γίνει με την συλλογή άγριου δίκταμου από περισσότερες τοποθεσίες ώστε να διαπιστωθεί αν ο συγκεκριμένος χημειότυπος ήταν χαρακτηριστικός της περιοχής και για το αν θα διαφέρουν δείγματα άγριου δίκταμου από άλλες περιοχές περισσότερο. Σίγουρα, όπως προαναφέρθηκε, οι διαφορές δεν είναι τόσο μεγάλες μεταξύ καλλιεργουμένου και άγριου ώστε να υποβαθμίζεται το καλλιεργούμενο, καθώς βλέπουμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ουσιών και δε αυτών που συμμετέχουν στην βιοδραστικότητά περισσότερο, είναι κοινές.

Η αντιμικροβιακή ιδιότητα είναι χαρακτηριστική του γένους *Origanum*, θα είχε όμως ενδιαφέρον να μελετηθεί εάν υπάρχει αντιμικροβιακή δράση και σε άλλα είδη βακτηρίων ή ακόμα και σε παθογόνους μύκητες, καθώς και η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία έχουμε αναστολή ή/και θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών.

Τέλος, η παρουσία της θυμοκινόνης στο άγριο δείγμα ήταν αρκετά ενδιαφέρουσα καθώς είναι μια ουσία που έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των ερευνητών για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες και ίσως θα ήταν συνετό να παρακολουθήσουμε και άλλους άγριους πληθυσμούς ώστε να καταλάβουμε εάν επρόκειτο για κάτι τυχαίο ή αν υπάρχει και σε άλλες τοποθεσίες.

4. Πίνακες, γραφήματα και πίτες αποτελεσμάτων

Ακολουθεί αναπαράσταση των αποτελεσμάτων και δεδομένων που παρήχθησαν από την χρωματογραφία και την φασματομετρία μαζών.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα από το GC-MS του άγριου *O. dictamnus*

Συστατικά	RT(min)	AI exp	AI βιβλιογραφία	% περιεκτικότητα wild
a thujene	7.06	926	924	0.60
a pinene	7.30	933	932	0.78
camphene	7.76	948	946	0.32
sabinene	8.53	972	969	0.86
3-octanone	8.78	980	979	0.23
myrcene	9.04	988	988	0.27
3- octanol	9.14	991	988	0.28
a-terpinene	10.03	1015	1014	0.55
p-cymene	10.26	1021	1020	31.69
limonene	10.49	1027	1024	0.29
γ terpinene	11.63	1056	1054	2.48
cis sabinene hydrate	11.96	1064	1065	0.36
terpinolene	12.82	1086	1086	0.11
linalool	13.22	1096	1095	0.48
trans pinocarveol	14.94	1136	1135	0.05
borneol	16.09	1163	1165	1.11
menthol	16.42	1171	1167	2.77
terpinen-4-ol	16.58	1174	1174	1.08
p-cymen-8-ol	16.77	1179	1179	0.28
a terpineol	17.12	1187	1186	0.31
cis dihydro carvone	17.31	1191	1191	0.14
trans dihydro carvone	17.65	1199	1200	0.09
pulegone	19.16	1234	1233	0.13
thymoquinone	19.53	1242	1248	2.34
thymol	21.42	1286	1289	0.13
carvacrol	21.83	1296	1298	48.69
unknown	22.59	1313		0.07
a cubabene	24.18	1351	1348	0.09
carvacrol acetate	24.81	1366	1370	0.17
α copaene	25.31	1378	1374	1.04
β cubabeneβ	25.87	1391	1387	0.51
E caryophyllene	27.11	1421	1417	0.26
Muurolo-4(14),5-diene <cis>	28.84	1464	1465	0.10
Cadina-1(6),4-diene (trans)	29.57	1482	1475	0.22
δ cadinene	31.20	1523	1522	0.40
thymohydro quinone	32.07	1546	1553	0.12
caryophyllene oxide	33.48	1582	1582	0.29
cubeno <1,10-di-epi->	34.69	1614	1618	0.16



Πίνακας 6 Αποτελέσματα GC-MS από τον καλλιεργούμενο *Origanum dictamnus*

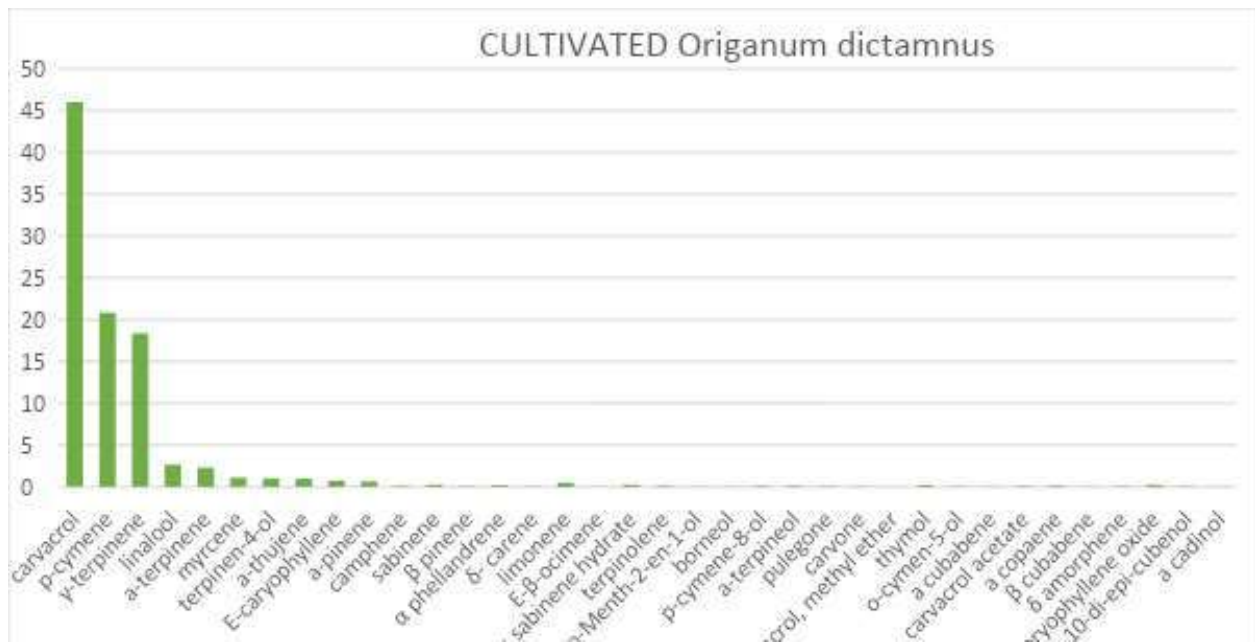
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	RT(min)	AI experimental	AI βιβλιογραφικό	% προεπιλεγμένο cultivated
a thujene	7.053	926	924	0.96
α pinene	7.292	933	932	0.64
Camphene	7.756	948	946	0.11
sabinene	8.538	972	969	0.25
β pinene	8.661	976	974	0.09
myrcene	9.039	988	988	1.10
3-octanol	9.145	991	988	0.09
α phellandrene	9.577	1004	1002	0.20
δ-carene	9.818	1010	1008	0.07
α terpinene	10.024	1015	1014	2.29
p-cymene	10.261	1021	1020	20.83
limonene	10.488	1027	1024	0.49
(E)-β-ocimene	11.16	1044	1044	0.04
γ terpinene	11.631	1056	1054	18.37
cis-sabinene hydrate	11.958	1064	1065	0.25
terpinolene	12.837	1086	1086	0.13
linalool	13.211	1096	1095	2.64
cis-p-Menth-2-en-1-ol	14.194	1119	1118	0.04
borneol	16.091	1163	1165	0.04
terpinen-4-ol	16.574	1174	1174	1.01
p-Cymen-8-ol	16.771	1179	1179	0.11
α terpineol	17.119	1187	1186	0.13
pulegone	19.166	1234	1233	0.09
carvone	19.319	1238	1239	0.06
Carvacrol, methyl ether	19.402	1240	1241	0.02
unknown	21.154	1280		0.07
thymol	21.426	1286	1289	0.21
o-Cymen-5-ol	21.557	1289		0.07
carvacrol	21.838	1296	1298	46.01
α cubebene	24.175	1351	1348	0.05
carvacrol acetate	24.81	1366	1370	0.09
α copaene	25.307	1378	1374	0.15
β cubebene	25.865	1391	1387	0.04
E-caryophyllene	27.108	1421	1417	0.72
δ amorphene	31.198	1523	1511	0.09
caryophyllene oxide	33.48	1582	1582	0.24
1,10-di-epi cubenol	34.695	1615	1618	0.07
α cadinol	36.098	1653	1652	0.03



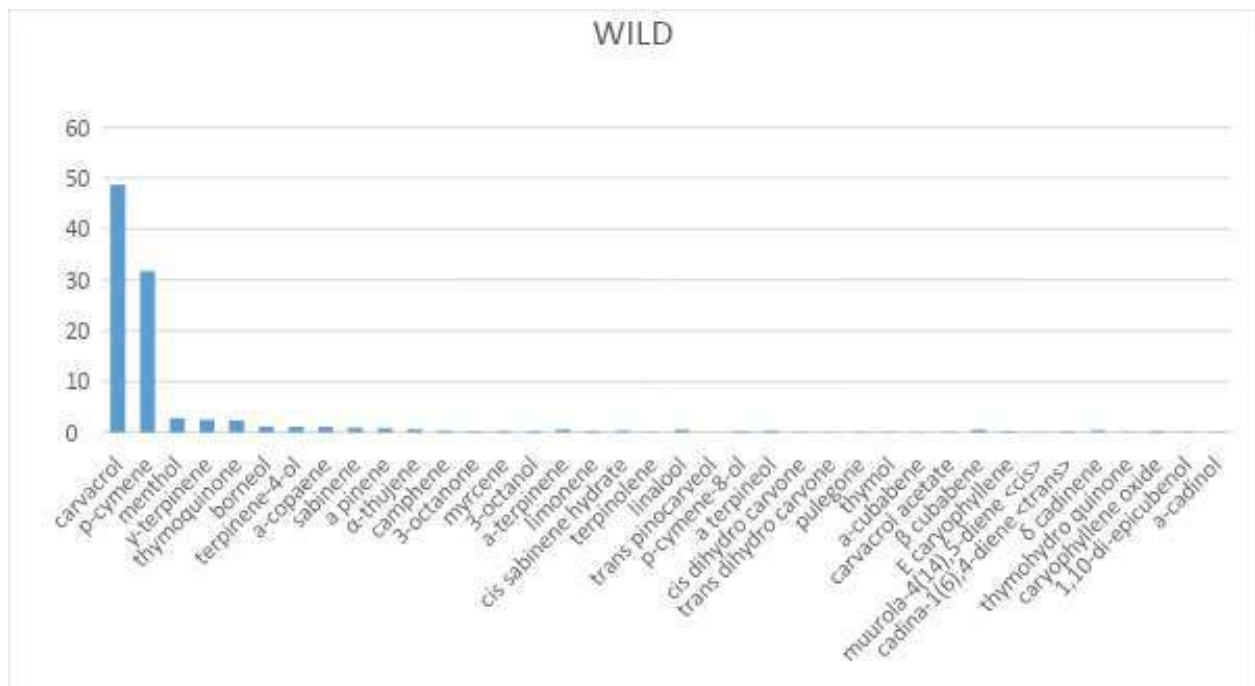
Πίνα δεδομένων 1 Τα 10 κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου του άγριου *O. dictamnus*



Πίνα δεδομένων 2 Τα 10 κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου του καλλιεργούμενου *O. dictamnus*



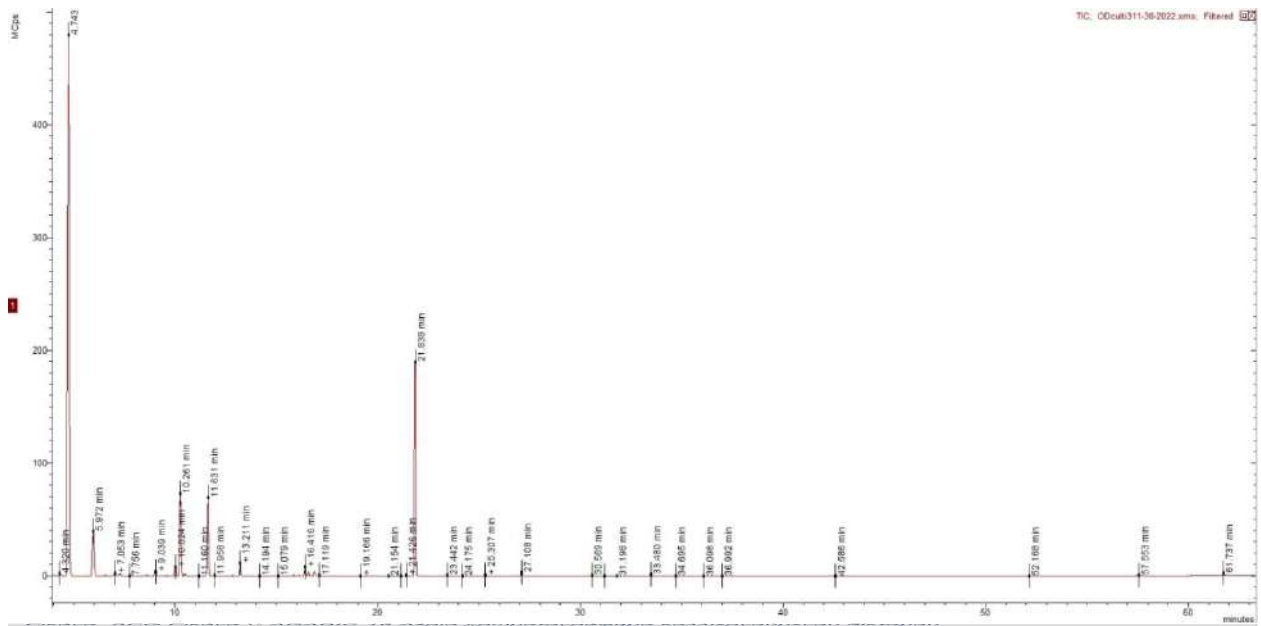
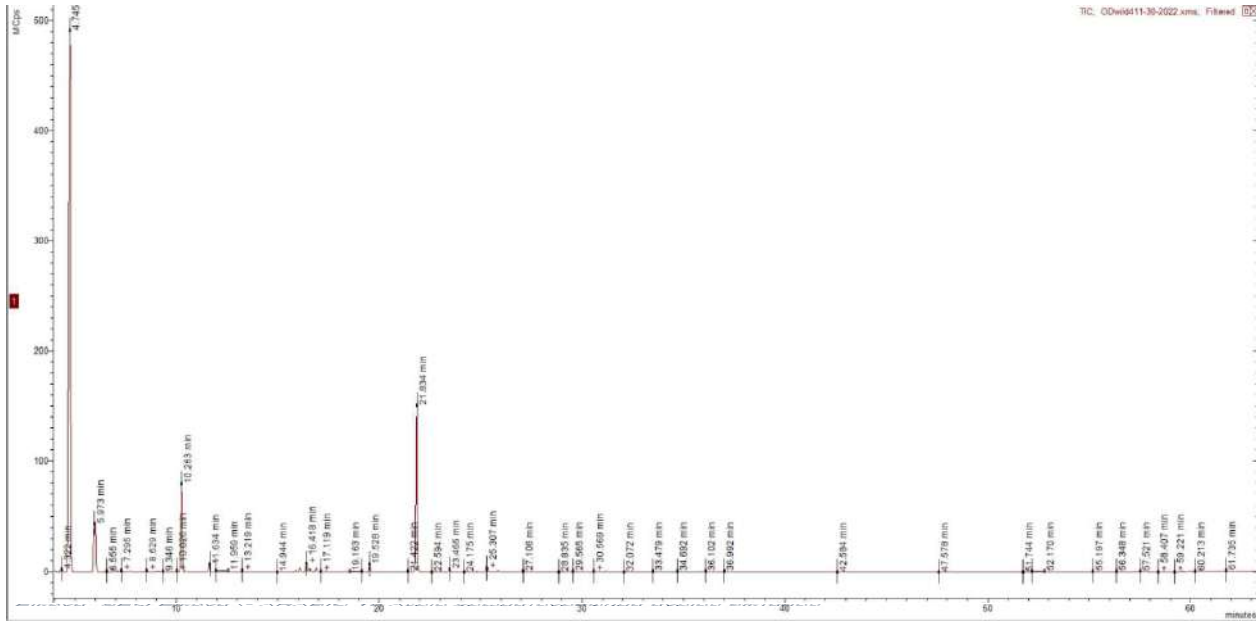
Γράφημα 1 Γράφημα που αναπαριστά όλες τις ουσίες που βρέθηκαν και την ποσότητα τους στο αιθέριο έλαιο του καλλιεργούμενου *O. dictamnus*

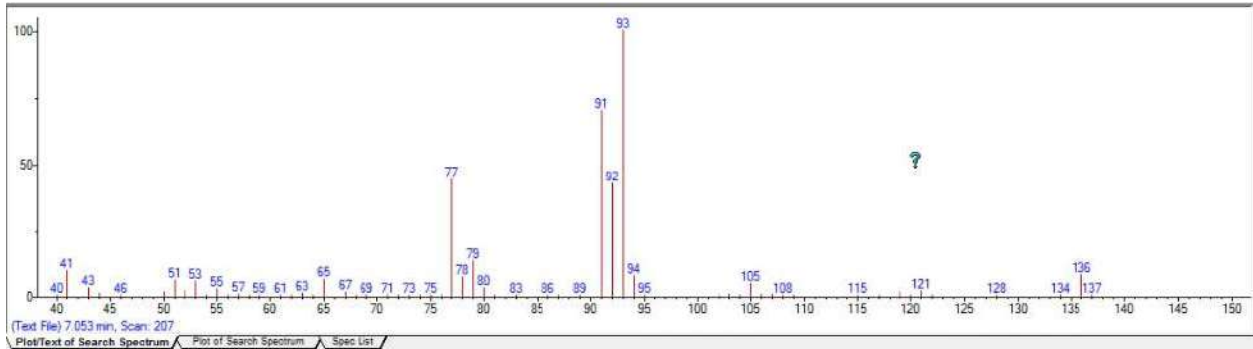


Γράφημα 2 Γράφημα που αναπαριστά όλες τις ουσίες και την ποσότητά τους στο αιθέριο έλαιο του άγριου *O. dictamnus*

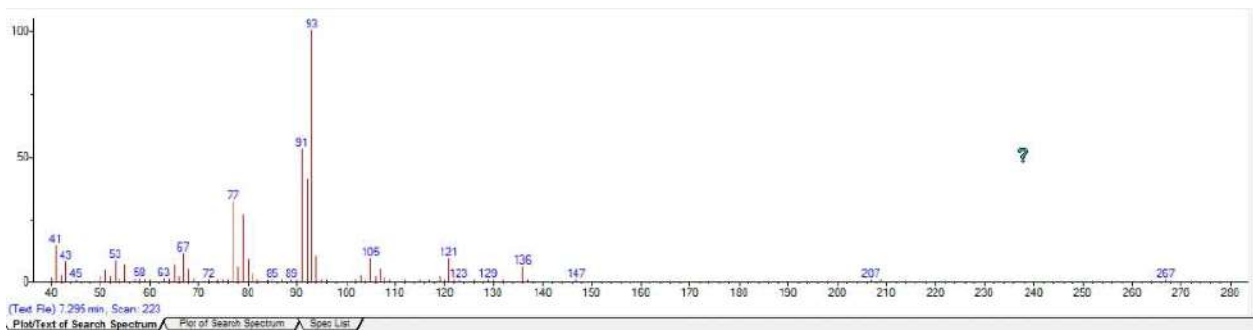
5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

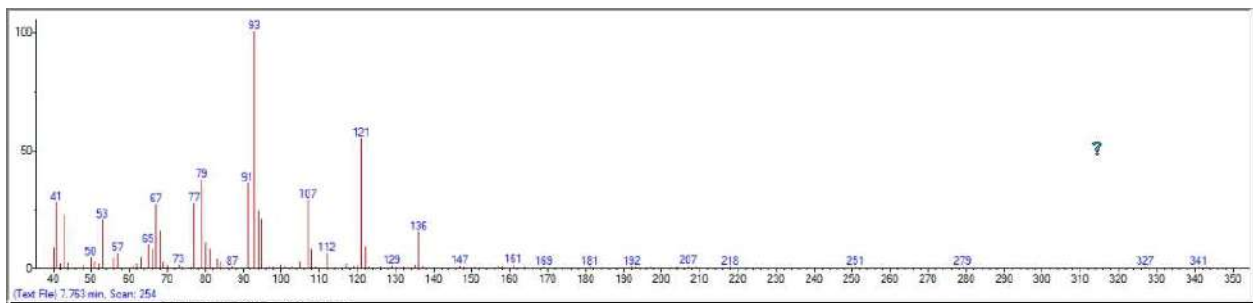




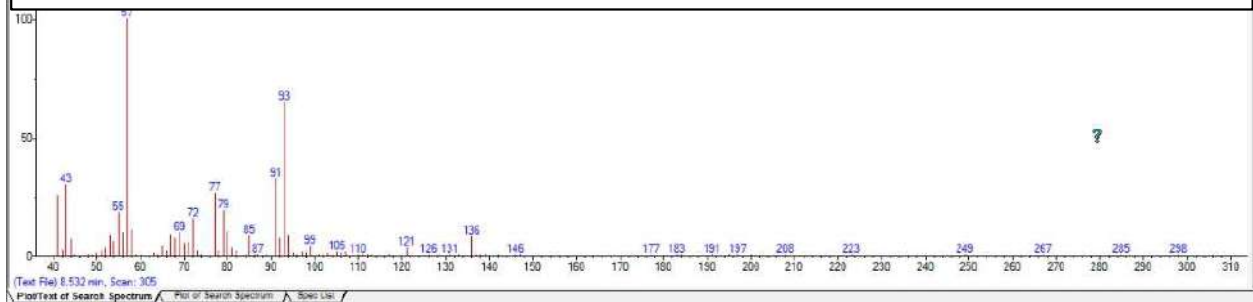
α-thujene MS φάσμα



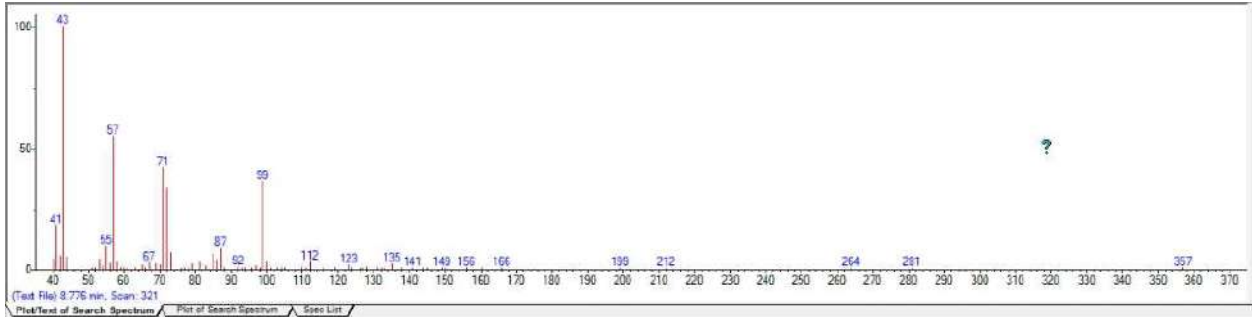
α-pinene MS φάσμα



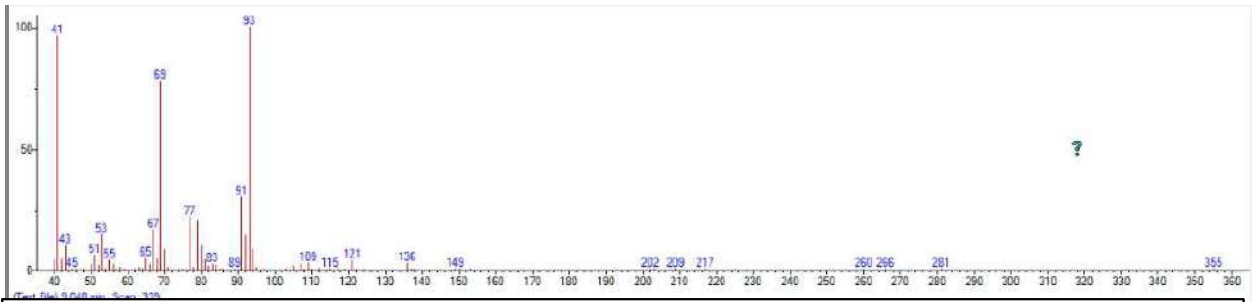
Camphene MS φάσμα



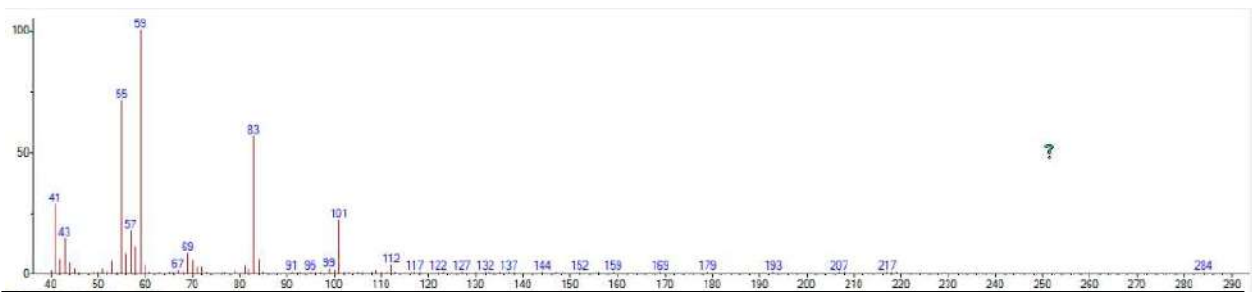
Sabinene MS φάσμα



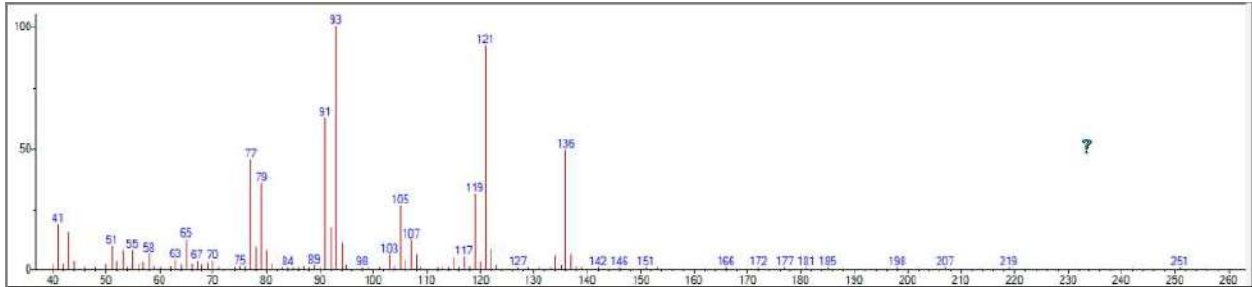
3-octanone MS φάσμα



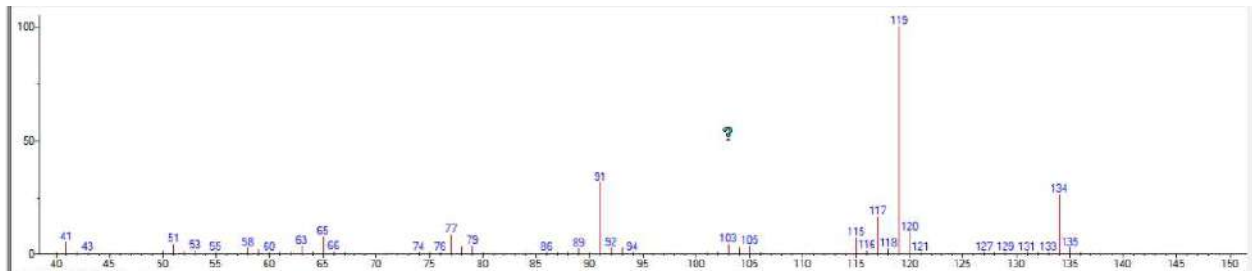
myrcene MS φάσμα



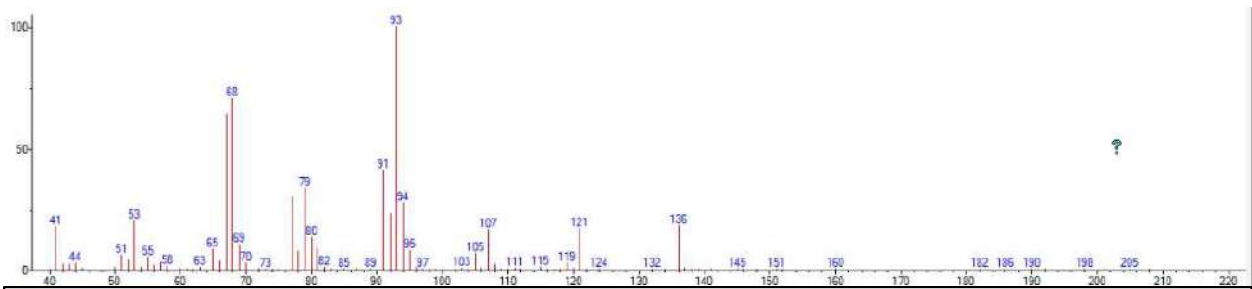
3-octanol MS φάσμα



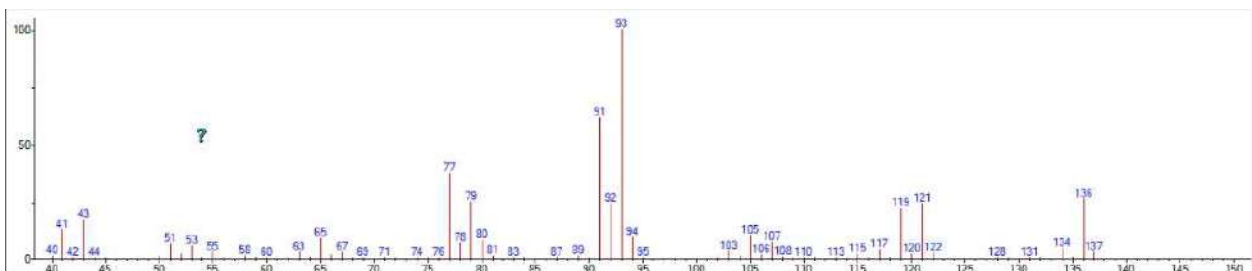
α -terpinene MS φάσμα



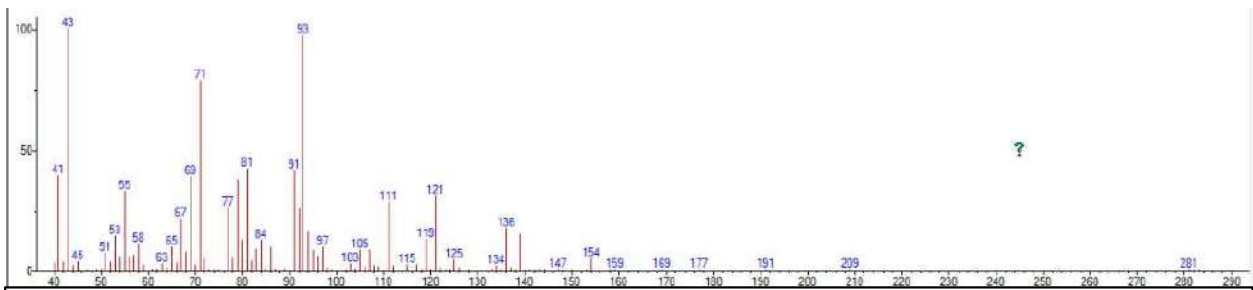
p-cymene MS φάσμα



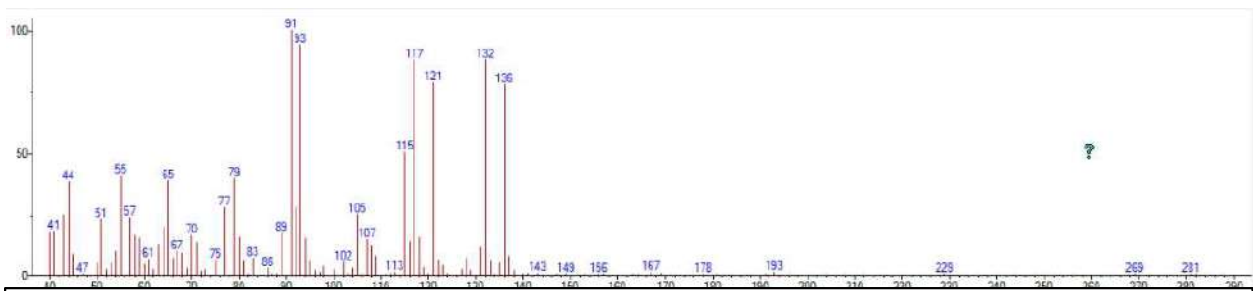
limonene MS φάσμα



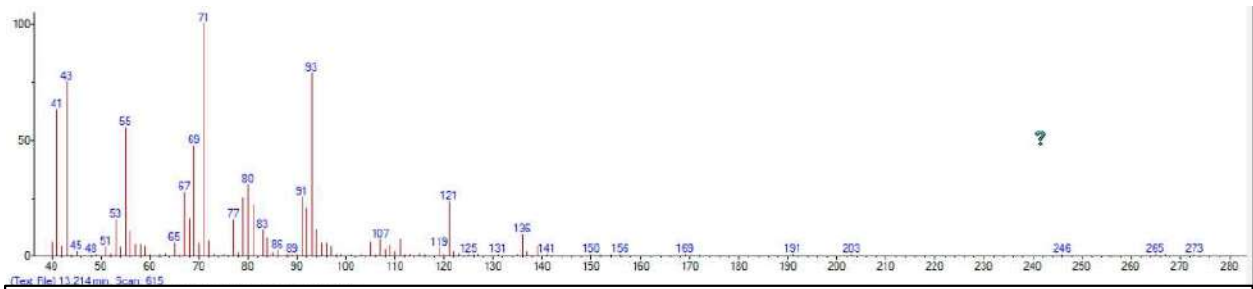
γ -terpinene MS φάσμα



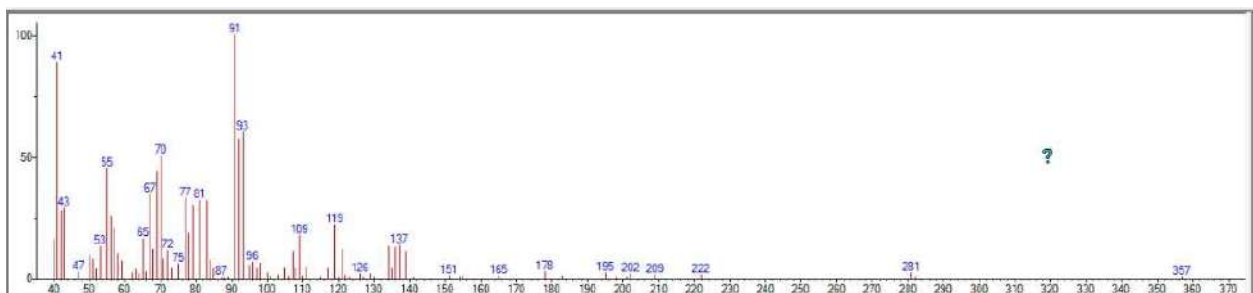
Cis-sabinene hydrate MS φάσμα



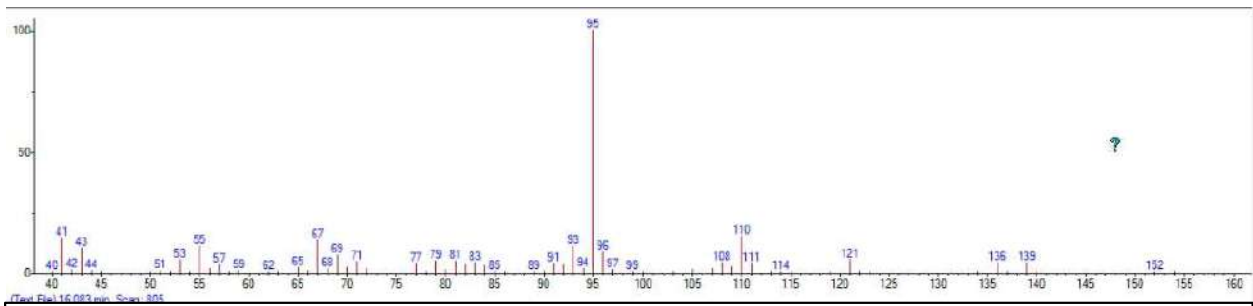
terpinolene hydrate MS φάσμα



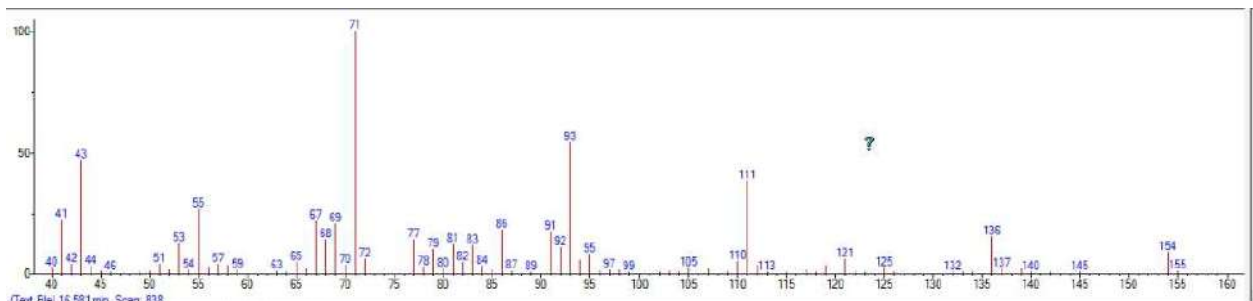
linalool MS φάσμα



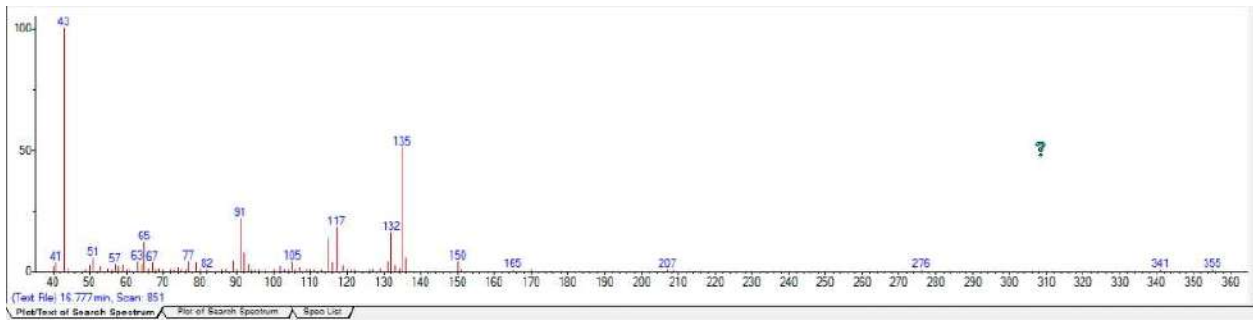
Trans-pinocarveol MS φάσμα



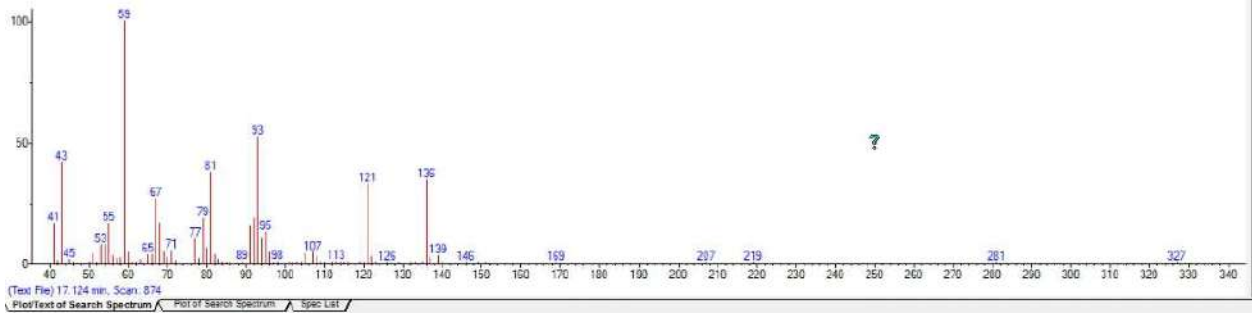
Borneol MS φάσμα



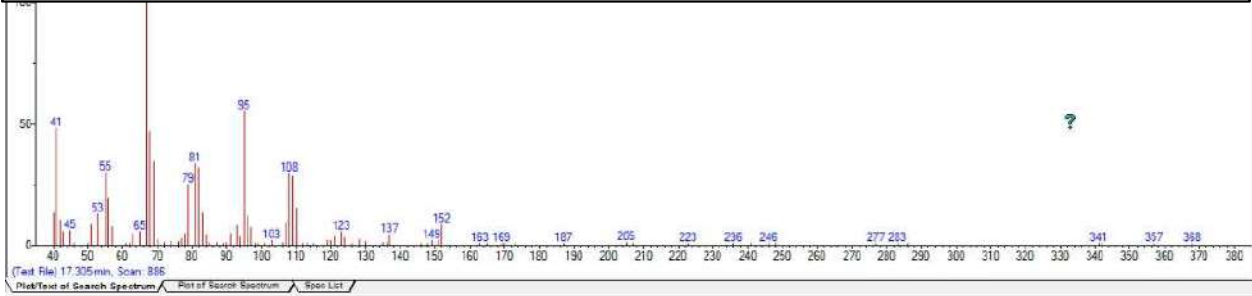
Terpinen-4-ol MS φάσμα



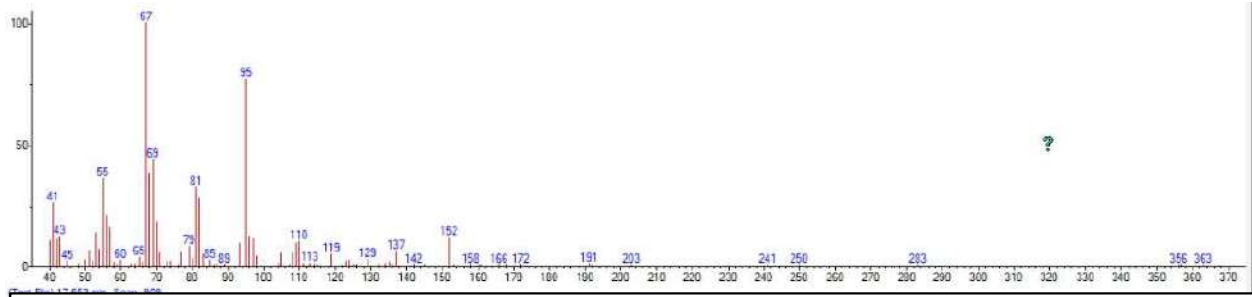
p-cymen-8-ol MS φάσμα



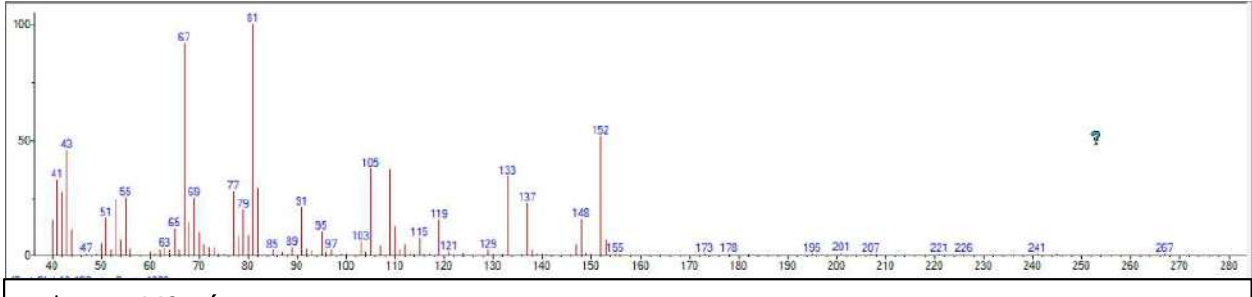
• Terpineol MS φάσμα



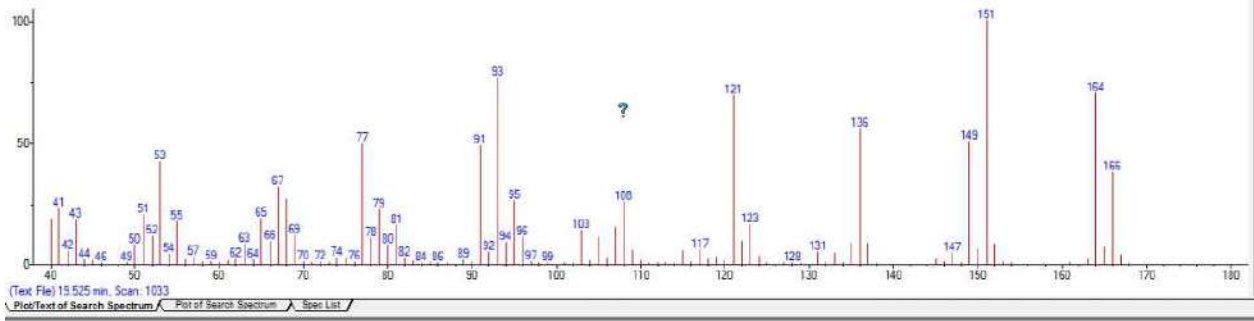
Cis dihydrocarvone MS φάσμα



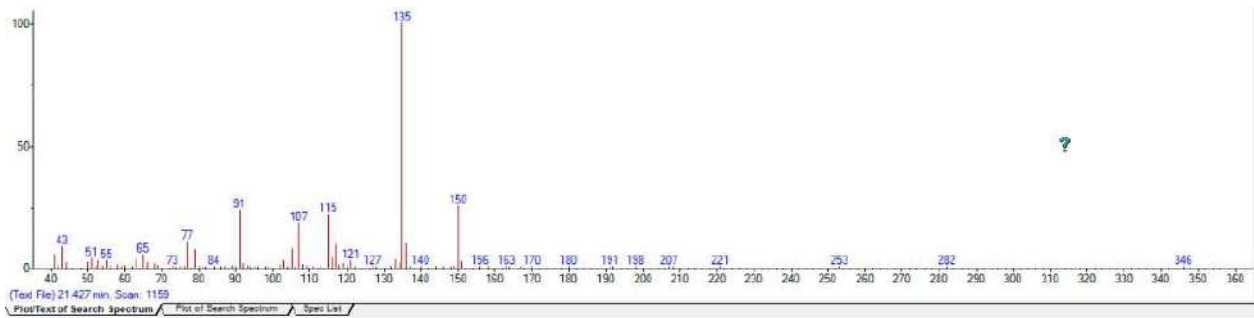
Trans dihydrocarvone MS φάσμα



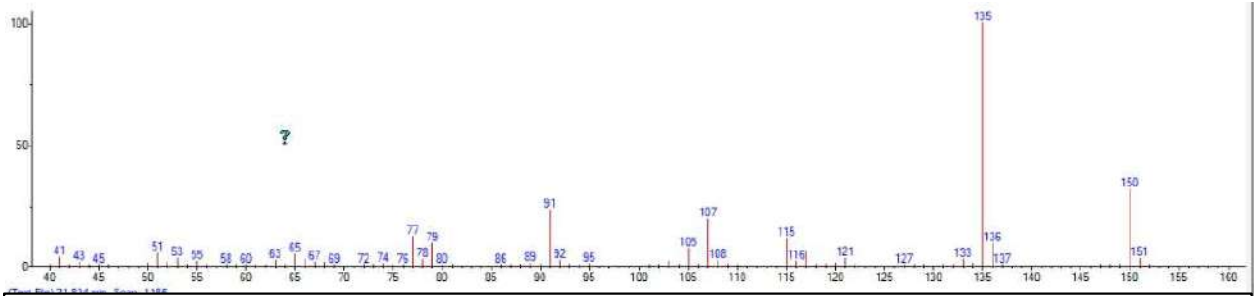
pulegone MS φάσμα



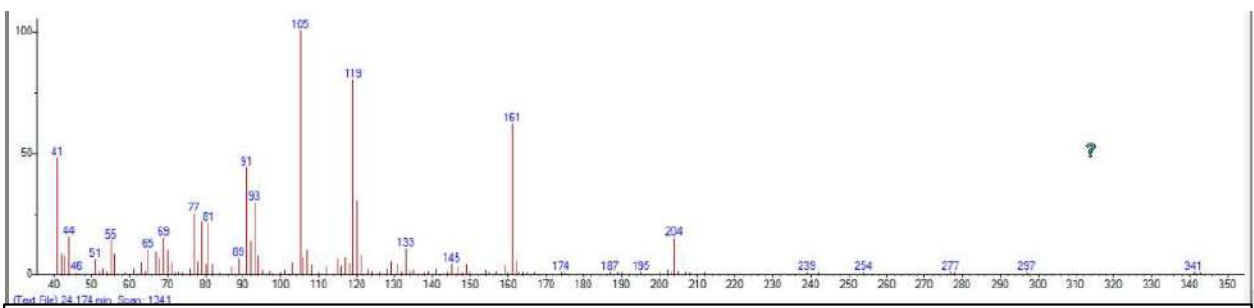
Thymoquinone MS φάσμα (Μόνο στο άγριο)



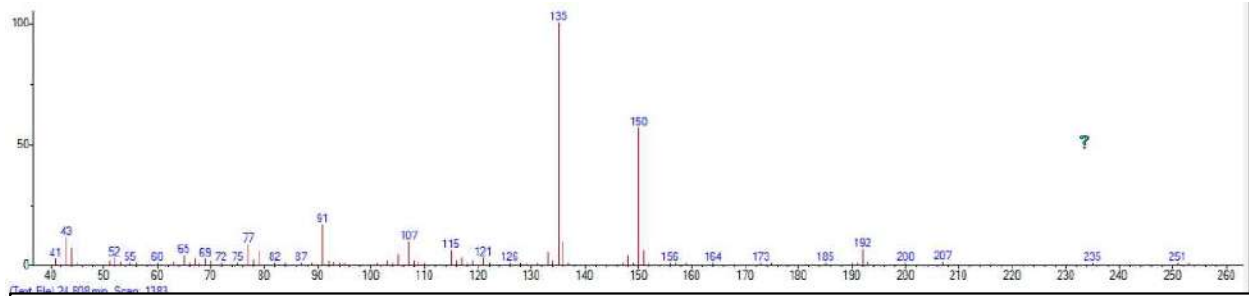
Thymol MS φάσμα



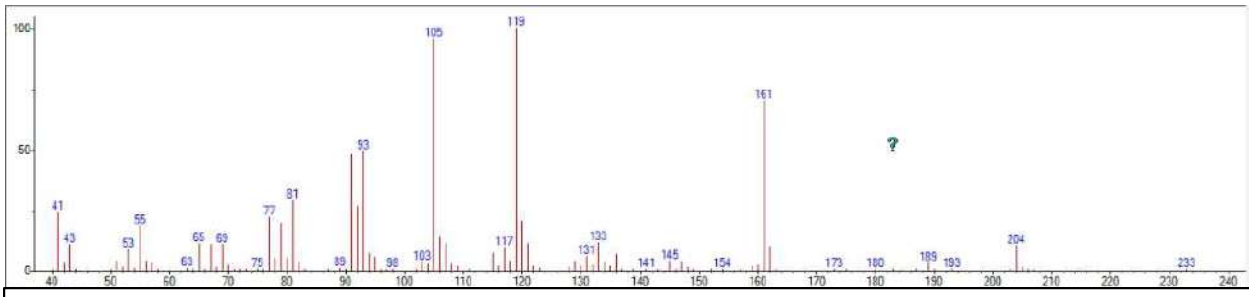
Carvacrol MS φάσμα



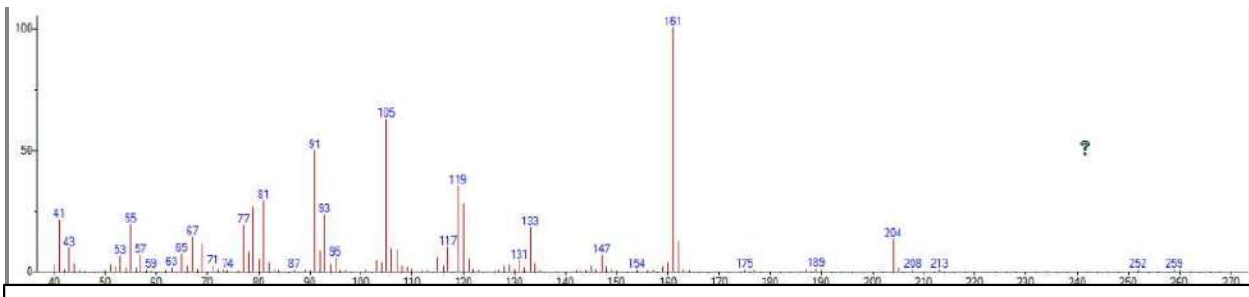
α- cubebene MS φάσμα



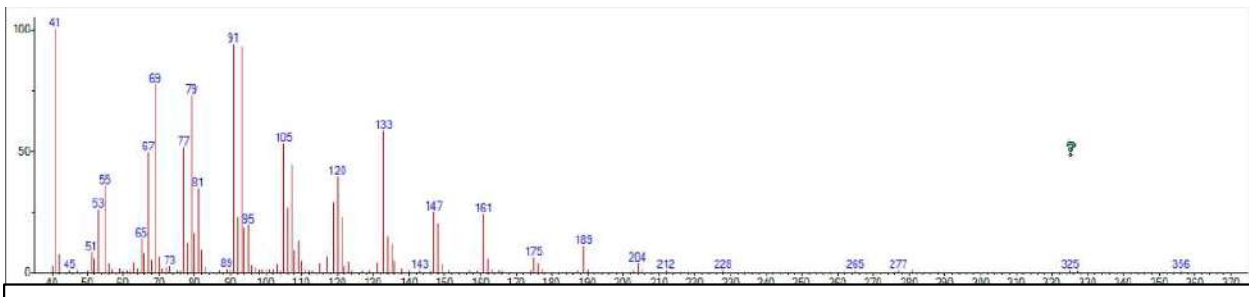
Carvacrol acetate MS φάσμα



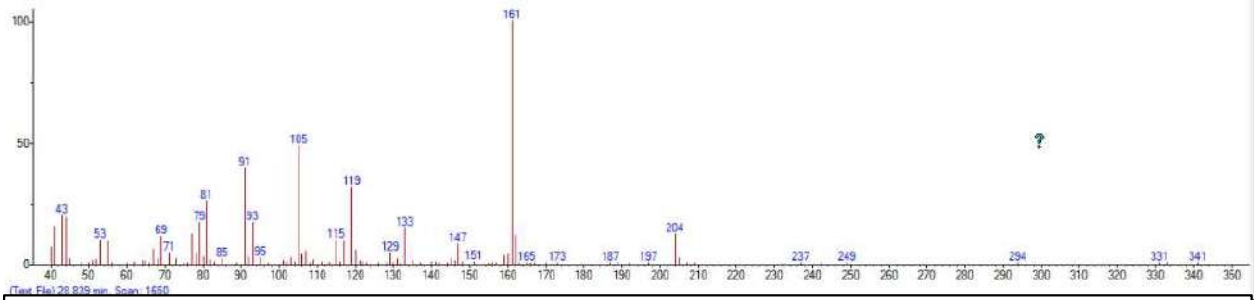
α- copaene MS φάσμα



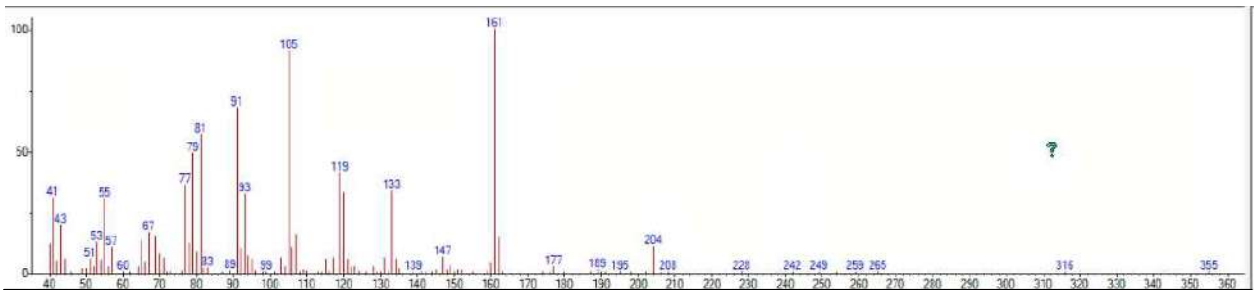
β- cubabene MS φάσμα



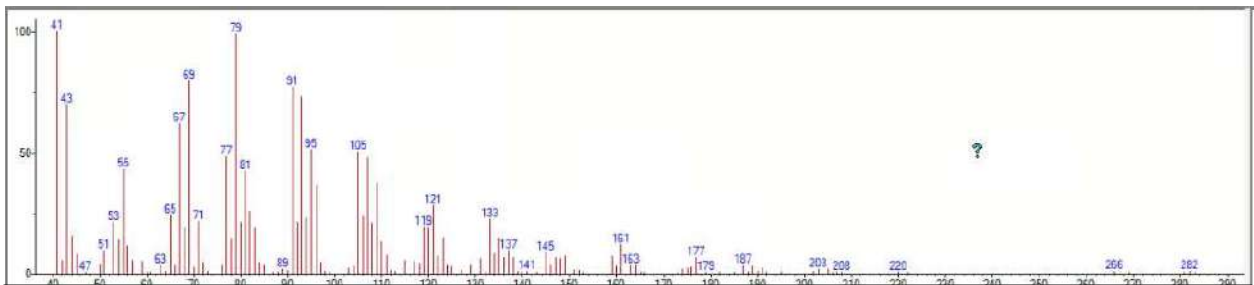
E-caryophyllene MS φάσμα



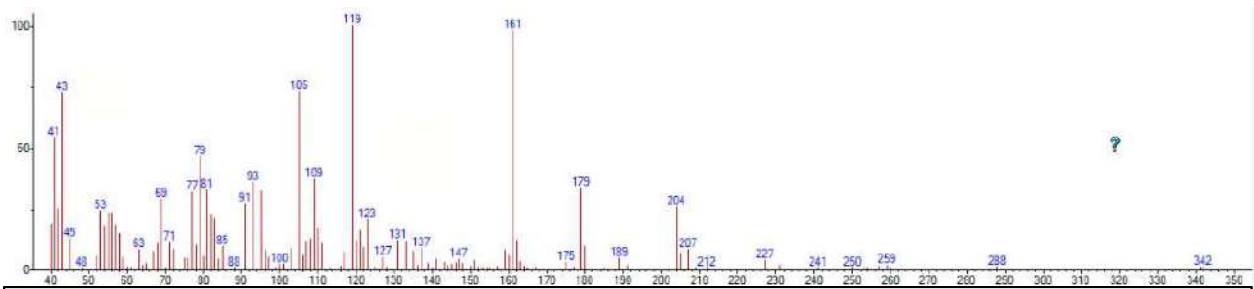
β -copaene MS φάσμα



Trans-cadina-1(6)-4-diene MS φάσμα



Caryophyllene oxide MS φάσμα



1,10-di-epicubenol MS φάσμα

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Ed.4. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083116584>
- A. Hill, R., & D. Connolly, J. (2015). Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 32(2), 273–327. <https://doi.org/10.1039/C4NP00101J>
- Alam, M., Bano, N., Ahmad, T., Sharangi, A. B., Upadhyay, T. K., Alraey, Y., Alabdallah, N. M., Rauf, M. A., & Saeed, M. (2022). Synergistic Role of Plant Extracts and Essential Oils against Multidrug Resistance and Gram-Negative Bacterial Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antibiotics*, 11(7), 855. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070855>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Atanasova, K. (2010). *Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell wall toxins in the lungs of pigs.*
- Badary, O., Hamza, M. S., & Tikamdas, R. (2021). Thymoquinone: A Promising Natural Compound with Potential Benefits for COVID-19 Prevention and Cure. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 15, 1819–1833. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S308863>
- Banchio, E., Xie, X., Zhang, H., & Paré, P. W. (2009). Soil Bacteria Elevate Essential Oil Accumulation and Emissions in Sweet Basil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 653–657. <https://doi.org/10.1021/jf8020305>
- Beltrán, J. M., & Esteban, M. (2016). Properties and Applications of Plants of Origanum Sp.Genus. *SM Journal of Biology*, 2, 1006.

Bern Convention, 2002. Bern/Berne, 19.IX.1979. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. APPENDIX I. Strictly Protected Flora Species.

[Http://conventions.coe.int/Treaty/FR/Treaties/Html/104-1.htm](http://conventions.coe.int/Treaty/FR/Treaties/Html/104-1.htm). (2002).

Bernhardt, T. G., & de Boer, P. A. J. (2005). SImA, a Nucleoid-Associated, FtsZ Binding Protein Required for Blocking Septal Ring Assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Molecular Cell*, 18(5), 555–564.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.012>

Bethanis, K., Tzamalís, P., Tsortekí, F., Kokkinou, A., Christoforides, E., & Mentzafos, D. (2013). Structural study of the inclusion compounds of thymol, carvacrol and eugenol in β -cyclodextrin by X-ray crystallography. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 77(1–4), 163–173.

<https://doi.org/10.1007/s10847-012-0230-9>

Bobasalidis A.M., K. S. E. (2002). *Bosabalidis, A.M., 2002. In: Kintzios, S.E. (Ed.), Origanum. The Genera Origanum and Lippia, Sec.2, Structural Features of Origanum sp. Taylor & Francis, London, pp. 11–64.*

Bosabalidis, A., & Tsekos, I. (1982). Glandular scale development and essential oil secretion in *Origanum dictamnus* L. *Planta*, 156(6), 496–504. <https://doi.org/10.1007/BF00392771>

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Carson, C. f., & Riley, T. v. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3), 264–269.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05025.x>

Chatzopoulou, A., Karioti, A., Gousiadou, C., Lax Vivancos, V., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., & Skaltsa, H. (2010). Depsides and Other Polar Constituents from *Origanum dictamnus* L. and Their in Vitro

- Antimicrobial Activity in Clinical Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6064–6068. <https://doi.org/10.1021/jf904596m>
- Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2002). Characterization of Essential Oils from Lamiaceae Species by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5503–5507. <https://doi.org/10.1021/jf0203489>
- Didry, N., Dubreuil, L., & Pinkas, M. (1993). Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*, 48(4), 301–304.
- Dilmopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A., & Tzanoudakis, D. (2016). Vascular plants of Greece: An annotated checklist. Supplement. *Willdenowia*, 46(3), 301–347.
- Economakis, C., Demetzos, C., Anastassaki, T., Papazoglou, V., Gazouli, M., Loukis, A., Thanos, C. A., & Harvala, C. (1999). Volatile Constituents of Bracts and Leaves of Wild and Cultivated *Origanum dictamnus*. *Planta Medica*, 65(2), 189–191. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960466>
- Fassoulas, C., Mouriki, D., Dimitriou-Nikolaou, P., & Iliopoulos, G. (2012). Quantitative Assessment of Geotopes as an Effective Tool for Geoheritage Management. *Geoheritage*, 4, 177–193.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Fragaki E.K. (1969). *Contribution to the Plant Local Names. Athens (in Greek)*.
- Friedman, M. (2014). Chemistry and Multibeneficial Bioactivities of Carvacrol (4-Isopropyl-2-methylphenol), a Component of Essential Oils Produced by Aromatic Plants and Spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7652–7670. <https://doi.org/10.1021/jf5023862>

- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, *65*(10), 1545–1560. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1545>
- Harvala, C. (1987). *Essential oil from Origanum dictamnus*.
- Heftmann, E. (2004). *Chromatography- Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods—Part A: Fundamentals and techniques* (6th ed., Vol. 69A). Journal of Chromatography, Elsevier.
- Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 131–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>
- Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., & Baerheim Svendsen, A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica*, *53*.
- Javed, H., Meeran, M. F. N., Jha, N. K., & Ojha, S. (2021). Carvacrol, a Plant Metabolite Targeting Viral Protease (Mpro) and ACE2 in Host Cells Can Be a Possible Candidate for COVID-19. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 601335. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601335>
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, *49*(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Kakouri, E., Daferera, D., Kanakis, C., Revelou, P.-K., Kaparakou, E. H., Dervisoglou, S., Perdakis, D., & Tarantilis, P. A. (2022). *Origanum majorana* Essential Oil—A Review of Its Chemical Profile and Pesticide Activity. *Life*, *12*(12), 1982. <https://doi.org/10.3390/life12121982>
- Khader, M., & Eckl, P. M. (2014). Thymoquinone: An emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran J Basic Med Sci*, *17*(12).

- Kim, S., & Zhang, X. (2015). Discovery of false identification using similarity difference in GC-MS-based metabolomics: Discovery of false identification in metabolomics. *Journal of Chemometrics*, 29(2), 80–86. <https://doi.org/10.1002/cem.2665>
- Kouremenos, A. (n.d.). *Origanum dictamnus (dittany of Crete): Testaments, uses, and trade of a sacred plant in antiquity*.
- Krigas, N., Lazari, D., Maloupa, E., & Stikoudi, M. (2015). Introducing Dittany of Crete (*Origanum dictamnus* L.) to gastronomy: A new culinary concept for a traditionally used medicinal plant. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2(2), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.02.001>
- Kumar, H., Franzetti, L., Kaushal, A., & Kumar, D. (2019). *Pseudomonas fluorescens*: A potential food spoiler and challenges and advances in its detection. *Annals of Microbiology*, 69(9), 873–883. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01501-7>
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. In K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products* (pp. 1543–1580). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57
- Lianopoulou, V., & Bosabalidis, A. M. (2014). Traits of seasonal dimorphism associated with adaptation to cold stress in *Origanum dictamnus* L. (Lamiaceae). *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), 17. <https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-17>
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>
- Liolios, C. C., Graikou, K., Skaltsa, E., & Chinou, I. (2010). Dittany of Crete: A botanical and ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.005>

- Lukáčová, M., Barák, I., & Kazár, J. (2008). Role of structural variations of polysaccharide antigens in the pathogenicity of Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(3), 200–206.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01876.x>
- Martínez-Francés, V., Rivera, D., Heinrich, M., Obón, C., & Ríos, S. (2015). An ethnopharmacological and historical analysis of “Dictamnus”, a European traditional herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *175*, 390–406. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.011>
- Mehalaine, S., & Chenchouni, H. (2020). Plants of the same place do not have the same metabolic pace: Soil properties affect differently essential oil yields of plants growing wild in semiarid Mediterranean lands. *Arabian Journal of Geosciences*, *13*(23), 1263.
<https://doi.org/10.1007/s12517-020-06219-4>
- Mitropoulou, G., Fitsiou, E., Stavropoulou, E., Papavassilopoulou, E., Vamvakias, M., Pappa, A., Oreopoulou, A., & Kourkoutas, Y. (2015). Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus* (*dittany*) essential oil. *Microbial Ecology in Health & Disease*, *26*(0). <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26543>
- Mondal, A., Bose, S., Mazumder, K., & Khanra, R. (2021). Carvacrol (*Origanum vulgare*): Therapeutic Properties and Molecular Mechanisms. In D. Pal & A. K. Nayak (Eds.), *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications* (Vol. 140, pp. 437–462). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-54027-2_13
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, *6*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Sarropoulou, V., Maloupa, E., & Grigoriadou, K. (2023). Cretan Dittany (*Origanum dictamnus* L.), a Valuable Local Endemic Plant: In Vitro Regeneration Potential of Different Type of Explants for Conservation and Sustainable Exploitation. *Plants*, *12*(1), 182.
<https://doi.org/10.3390/plants12010182>

- Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., & Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927–948. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14>
- Sell, C. S. (2003). *A fragrant introduction to Terpenoid Chemistry*. Quest International.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1202–1205. <https://doi.org/10.1021/jf950540t>
- Skrubis, B. (1979). *Origanum dictamnus* L., a Greek native plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(4), 411–415. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(79\)80006-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(79)80006-9)
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis: Gas Chromatography. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>
- Tamokou, J. D. D. (2017). *Chapter 8—Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables*.
- Thielmann, J., Muranyi, P., & Kazman, P. (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(6), e01860. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01860>
- Tursun, A. O. (2022). Impact of soil types on chemical composition of essential oil of purple basil. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(7), 103314. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103314>
- Vogel. (1989). *Textbook of Practical organic Chemistry* (Vol. 5th).
- Vrachnakis, T. (n.d.). *Trichomes of Origanum dictamnus* L. (*Labiatae*).
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2–3), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>

- Werker, E. (1993). Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae—A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 8(5), 249–255. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730080503>
- Zhou, C., Li, Z., Wiberley-Bradford, A. E., Weise, S. E., & Sharkey, T. D. (2013). Isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate/isopentenyl diphosphate ratio measured with recombinant isopentenyl diphosphate isomerase and isoprene synthase. *Analytical Biochemistry*, 440(2), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.05.028>