

# PREPARATION D'ADN GENOMIQUE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PAR LYSE AVEC LE CARVACROL

***Louasté Bouchra***

Université sidi Mohammed Ben Abdellah, Faculté des sciences, Laboratoire  
de Biotechnologie, Fès, Maroc

***Boudine Latifa***

Université sidi Mohammed Ben Abdellah, Faculté des sciences, Laboratoire  
de Biotechnologie, Fès, Maroc

***Eloutassi Noureddine***

Centre Régional des Métiers de l'Education et de la Formation, Laboratoire  
des Sciences de la vie et de la terre, Fès, Maroc

---

## **Abstract**

This work is a development of a genomic DNA extraction method from *Staphylococcus aureus*. This procedure uses just carvacrol in the step of cell lysis. This is a simple, fast and economical, in addition, the extracted DNA was in good quantity and quality and can be used in various applications of molecular biology.

---

**Keywords:** Carvacrol, cell lysis, genomic DNA, *Staphylococcus aureus*

---

## **Résumé**

Le présent travail est une mise au point d'une méthode d'extraction d'ADN génomique de *Staphylococcus aureus*. c'est une procédure qui utilise uniquement le carvacrol dans l'étape de lyse cellulaire. C'est une technique simple rapide et économique, en plus, les résultats indiquent que l'ADN extrait est de bon rendement et de haute qualité d'où son application dans les techniques de biologie moléculaire.

---

**Mots clés:** ADN génomique, carvacrol, lyse cellulaire, *Staphylococcus aureus*

## Introduction

*Staphylococcus aureus* est l'une des bactéries les plus pathogènes pour l'Homme à cause de sa capacité à coloniser de multiples organes et tissus (Sheagren 1984). Elle peut déclencher des inflammations de la peau, des endocardites, des abcès, des pneumonies ou des septicémies (Fidalgo *et al*, 1990; Holmes *et al* 2005). En plus, elle est très impliquée dans les infections nosocomiales (Grundmann *et al*, 2002; Martineau *et al*, 2001). Elle est à l'origine d'intoxications alimentaires par la production d'une grande variété d'entérotoxines (Orwin *et al*, 2003; Rosec *et al*, 1997; Shafer & Iandolo 1979).

Les études d'épidémiologie moléculaire ainsi que de nombreuses applications de dépistage exigent une bonne extraction d'ADN génomique. Cependant, la paroi des staphylocoques ainsi que les autres bactéries à Gram positif est connue par sa rigidité suite à la présence d'une couche très épaisse de peptidoglycane traversée latéralement par les acides lipotéicoïques (Navarre & Schneewind; 1999). Cette structure rend ces bactéries plus résistantes contre la lyse mécanique, chimique et osmotique couramment utilisée pour traiter les bactéries à Gram négatif (Salton 1952).

La structure de l'enveloppe des bactéries à Gram positive impose une étape de lyse assez longue dans les protocoles d'extraction d'ADN. Elle met en jeu un détergent comme le SDS, qui désorganise la bicouche lipidique de la membrane. Le lysozyme va hydrolyser les peptidoglycanes de la paroi. La lysostaphine est aussi utilisé pour perturber la couche de peptidoglycanes (Chen *et al*, 2001). La dissociation des protéines est réalisée avec la protéinase K à 65°C (Chapaval *et al*, 2008), qui peut être remplacée par le perchlorate de sodium, agent dénaturant précipitant (Dyer & Iandolo, 1983; Hiramatsu *et al*, 1991; Marmur 1963; Martineau *et al*, 1998).

L'efficacité du carvacrol comme agent lysant a été démontré dans le but d'extraire l'ADN génomique de deux bactéries à Gram négative pendant seulement 5 min (Louaste *et al*, 2012).

La présente étude est une mise au point d'une méthode de lyse cellulaire utilisant le carvacrol comme unique agent de lyse afin de préparer l'ADN génomique de *S. aureus* en minimisant le temps et le cout des méthodes ordinaires. Ce produit est le composé majoritaire des huiles essentielles d'Origan (Aligiannis *et al*, 2001; Hiramatsu *et al*, 1991) et de Thym (Cosentino *et al*, 1999) et a la capacité d'altérer la structure et la perméabilité des bactéries et des levures (Bakker *et al*, 1981; Bennis *et al*, 2004; Rhayour *et al*, 2003).

## **Matériel Et Méthodes**

### **1. Souche bactérienne et culture cellulaire**

La souche *Staphylococcus aureus* a été isolée du milieu hospitalier et identifiée par le test biochemical microtests : API (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), c'est une souche multirésistante à AP, AX, CFI, GN, BA, PP, CO (Ezzaouia *et al.*, 2007).

A partir d'une culture fraîche sur milieu LB solide, une colonie de *Staphylococcus aureus* est isolée et transférée dans 5 ml du milieu LB liquide puis incubée à 37°C pendant 16 à 18h. 1,5 ml de la même culture sont prélevés dans un tube Eppendorf stérile puis centrifugés à 12000 x g à 4°C pendant 5 min. Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec 200 µl de tampon de pré- lyse TEG (25 mM Tris HCl à pH 8, 10 mM EDTA à pH 8, 50 mM glucose).

### **2. Lyse cellulaire avec le carvacrol**

#### **Dispersion du carvacrol**

Le carvacrol pure (FlukaChemika) est d'abord mis en émulsion dans un volume de 100 µl d'agar stérile (0,2%) à une concentration finale de 10% (v/v) (Remmal *et al.*, 1993)

#### **Lyse cellulaire**

Le culot cellulaire est resuspendu dans 400 µl de l'émulsion du carvacrol diluée 50 fois dans le TEG pour parvenir à la concentration de 1/500 (v/v), qui correspondent à 1,3 mM.

La suspension est incubée pendant 10, 20 et 30 min à 37°C, puis elle est mélangée par vortex toutes les 5 min.

#### **Précipitation de l'ADN**

A chacune des suspensions précédentes, 200 µl d'une solution d'acétate de sodium (5M pH 7) froide maintenu à 4°C sont ensuite ajoutés. Les tubes sont placés dans la glace pendant 10 min, puis centrifugés à 12000 x g à 4°C pendant 15 min. Les surnageants sont prélevés dans de nouveaux tubes Eppendorf stériles.

2 volumes d'éthanol absolu refroidi à -20°C sont ajoutés aux surnageants, puis incubés à -70°C pendant 20 min.

Après centrifugation à 10000 x g pendant 20 min, le culot d'ADN obtenu est rincé avec l'éthanol 70% (v/v) puis séché.

Le culot d'ADN est resuspendu dans 50 µl de TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA à pH 8) puis stocké à -20 °C.

3 µl de chaque préparation sont déposés sur gel d'agarose en plus du marqueur de taille Ladder 1kb+ (Promega).

Une étape de traitement avec le phénol - chloroforme - alcool isoamylique est réalisée lorsque l'ADN est utilisé pour la digestion enzymatique (Sambrook *et al.*, 1989)

### **Traitement au phénol-chloroforme-alcool-isoamylique**

Ce traitement se fait avant l'étape de précipitation de l'ADN avec l'éthanol absolu. Le phénol doit être équilibré par le Tris-HCl (pH8) et additionné d'hydroxyquinoléine qui est un antioxydant qui colore le phénol en jaune. Le même volume de la mixture phénol-chloroforme-alcool-isoamylique (25/24/1, v/v/v) est ajouté à la solution puis mélangé de manière à former et maintenir une émulsion pendant quelques minutes.

Le tube est ensuite centrifugé à 12000 x g pendant 5 min à température ambiante pour séparer la phase aqueuse de la phase phénolique.

La phase aqueuse supérieure, qui contient l'ADN génomique est récupérée dans un nouveau tube, puis traitée de la même façon avec le chloroforme-alcool-isoamylique (24/1, v/v) pour éliminer toute trace de phénol.

### **Traitement à la RNase**

Avant de mesurer l'absorbance de la préparation d'ADN obtenue, et afin d'éliminer toute trace d'ARN, on procède à un autre traitement avec la RNase free DNase (Promega) à 50 µg/ml à 37°C pendant 1h. Ce traitement se fait après la suspension de l'ADN dans le TE ou mieux avant l'étape de précipitation avec l'éthanol absolu.

### **Préparation de l'ADN génomique de *Staphylococcus aureus* par la méthode de Martineau *et al* (1998)**

#### **Culture cellulaire**

1,5 ml de culture précédente sont prélevés dans un tube Eppendorf stérile puis centrifugés à 7000 x g pendant 5 min.

#### **Lyse cellulaire**

Le culot est resuspendu dans 1ml d'une solution contenant 200 µg/ml de lysostaphine et 100 µg/ml de lysozyme puis incubé pendant 30 min à 37°C. Ensuite la préparation est traitée avec 100 µg/ml de protéinase K pendant 60 min à 37 °C. La suspension est traitée avec le phénol-chloroforme-alcoolisoamylique.

#### **Précipitation de l'ADN**

L'ADN est précipité de la même manière que le protocole précédent. 3 µl de chaque préparation ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

#### **Quantification et qualification de l'ADN**

La quantification d'ADN stocké dans le TE est déterminée spectrophotométriquement. La mesure de la densité optique à 260 nm est réalisée pour des solutions d'ADN diluées avec l'eau distillée au 1/100 dans des cuves en quartz de 1 ml à l'aide d'un spectrophotomètre type UV/Visible de marque Jenway 6 105. L'ADN a un spectre d'absorption en UV maximum à

260 nm. Ce spectre est proportionnel à la concentration d'ADN, ainsi, une unité de densité optique à 260 nm correspond à 50 µg d'ADN double brin par µl.

En tenant compte de la dilution réalisée, la concentration d'ADN est donc calculée à partir de la relation :  $[ADN] \text{ en } \mu\text{g/ml} = A_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$ .

L'absorbance de l'ADN à 280 nm a été mesurée afin de calculer le rapport  $R = A_{260}/A_{280}$ . Ce rapport constitue un bon indicateur pour apprécier une éventuelle contamination de l'ADN par les protéines.

### Digestion enzymatique

La digestion enzymatique est réalisée selon la technique standard (Sambrook *et al*, 1989) avec l'enzyme *EcoRI* (Promega).

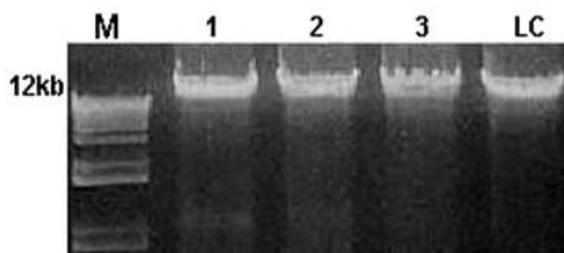
Le mélange réactionnel est constitué de 4 µl de la préparation d'ADN, 0,5 µl de l'enzyme de restriction (10 U/µl), 2 µl du tampon de l'enzyme 10 x et de l'eau distillée stérile qsp 20 µl. L'eau distillée est toujours mise en premier dans le tube auquel sont ajoutés le tampon, l'ADN et l'enzyme.

Le mélange est incubé à 37°C à l'obscurité pendant 1h à 2h. Au bout de ce temps, 4 µl de la solution de charge sont ajoutés dans le tube, puis l'ADN est chargé dans le gel.

## Résultats

### Profil de l'ADN

La lyse de *Staphylococcus aureus* avec le carvacrol à 1,3 mM a permis d'obtenir de l'ADN génomique sous forme de bandes claires et distinctes dès 10 min d'incubation (Figure 1).



**Figure 1 :** Électrophorèse sur gel d'agarose (0,5 %) de l'ADN génomique de *Staphylococcus aureus* après lyse avec le carvacrol (1,3 mM) pendant 10, 20 et 30 min (1, 2, 3) ou par la méthode classique, (LC), M: Marqueur de taille Ladder 1kb+.

### QUANTIFICATION ET QUALIFICATION DE L'ADN

La quantité d'ADN génomique de *S. aureus* augmente en fonction du temps d'incubation avec le carvacrol (Tableau 1). À 10 min, la concentration d'ADN est de 0,43 µg/µl alors qu'elle atteint 0,68 µg/µl à 30 min. Le rapport de pureté  $R (A_{260}/A_{280})$  se situe dans l'intervalle 1,76-1,95 : l'ADN peut être qualifié de pur. Ce résultat est similaire à celui obtenu par la méthode de

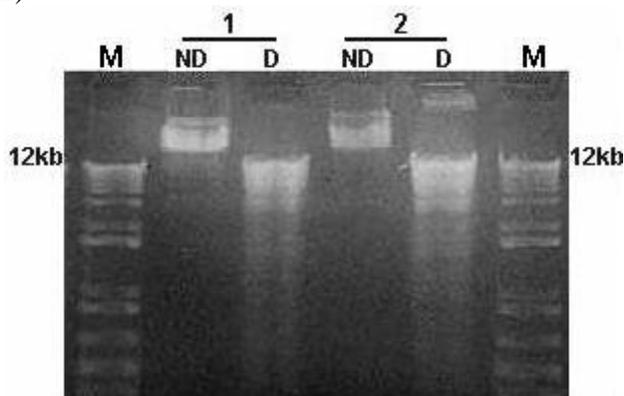
Martineau *et al*, (1998), où *S. aureus* a été traité avec le lysozyme et la protéinase K pendant 90 min.

**Tableau 1:** Moyennes des concentrations et rapports  $A_{260}/A_{280}$  de l'ADN génomique de *Staphylococcus aureus* préparé avec la méthode de lyse avec le carvacrol pendant 10, 20 et 30 min comparé avec la méthode de Martineau *et al*, (1998)

Carvacrol (1,3 mM)	Concentration d'ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	R : $A_{260}/A_{280}$
10 min	$0,43 \pm 0,017$	$1,93 \pm 0,028$
20 min	$0,53 \pm 0,028$	$1,95 \pm 0,016$
30 min	$0,68 \pm 0,003$	$1,76 \pm 0,035$
Martineau <i>et al</i>	$0,62 \pm 0,006$	$2,01 \pm 0,021$

### DIGESTION ENZYMATIQUE

L'ADN traité avec l'enzyme de restriction *EcoRI* se présente sous forme de plusieurs bandes de différentes tailles indiquant que la digestion est totale (Figure 2).



**Figure 2 :** Électrophorèse sur gel d'agarose (0,7 %) de l'ADN de *Staphylococcus aureus* non digéré (ND) et digéré (D) par l'enzyme de restriction *EcoRI* préparé par la méthode d'extraction avec le carvacrol pendant 30 min (puits 1) ou par la méthode classique, (puits 2), M: Marqueur de taille Ladder 1kb+.

### Discussion

Dans cette étude, le seul produit utilisé pour la lyse cellulaire de *Staphylococcus aureus* est le carvacrol à 37°C. L'efficacité du carvacrol sur toute l'enveloppe bactérienne a été évaluée par l'extraction de l'ADN génomique et sa quantification ainsi que sa qualification.

Les résultats montrent que le carvacrol a lysé *Staphylococcus aureus* sans causer des altérations sur le profil de son ADN génomique, sa taille, sa digestibilité ou sa pureté. Donc, le carvacrol n'a aucune influence sur les sites de restriction enzymatique et, par conséquent, sur l'intégrité de l'ADN préparé.

Concernant son mécanisme d'action, le carvacrol, qui est un monoterpène phénolique à groupement hydroxyle cause une déstabilisation de la membrane et une diminution du potentiel membranaire (Ultee *et al*, 2002).

Des travaux ont proposé que la première cible du carvacrol est la membrane plasmique (Helander *et al*, 1998; Pol & Smid, 1999; Ultee *et al*, 1998). L'accumulation de ce produit dans la bicouche lipidique conduit à une interruption des fonctions et de la structure membranaire (Helander *et al*, 1998; Pol & Smid, 1999). Ainsi la perméabilité de la membrane augmente (Xu *et al*, 2008) et les enzymes cytoplasmiques impliquées dans la maintenance de la pression osmotique, la régulation du pH cytoplasmique et la production d'énergie sont affectées (Bakker *et al*, 1981; Pol & Smid, 1999).

Des études ont montré que le carvacrol cause une altération structurale de l'enveloppe cellulaire d'*Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, de *Pseudomonas fluorescens*, et de *Brochothrix thermosphacta* (Di Pasqua *et al*, 2007). En plus il cause une perturbation de la fraction lipidique de la membrane plasmique de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* (Cristani *et al*, 2007).

Le thymol, isomère du carvacrol, induit une détérioration de la paroi et de la membrane plasmique d'*Escherichia coli*, de *Bacillus subtilis* et de *Saccharomyces cerevisiae* (Bennis *et al*, 2004; Chami *et al*, 2005a; Chami *et al*, 2005b; Rhayour *et al*, 2003).

Le thymol cause aussi une perturbation de la fraction lipidique des membranes plasmiques bactériennes, entraînant des altérations de la perméabilité membranaire et une fuite de matériaux intracellulaires (Trombetta *et al*, 2005).

Concernant le mécanisme moléculaire, le carvacrol et le thymol diminuent la concentration intracellulaire d'ATP chez d'*Escherichia coli* et augmente aussi l'ATP extracellulaire, indiquant une action perturbatrice de la membrane cytoplasmique (Helander *et al*, 1998).

De même le traitement de *Bacillus cereus* avec le carvacrol perturbe l'intégrité de la membrane et induit une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP (Ayari 2010).

Une étude récente montre que le carvacrol induit un déséquilibre de deux ions  $Ca^{2+}$  et  $H^{+}$  impliqués dans l'homéostasie de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce qui suggère que le carvacrol a un mode d'action ciblé au lieu d'une lésion non spécifique des membranes (Rao *et al*, 2010)

## Conclusion

En conclusion, l'utilisation de la méthode de lyse avec le carvacrol permet un gain du temps de la lyse passant de 90 à 10-30 min. La technique utilisant un seul produit est plus simple et économique.

## Références:

- Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S., Chinou I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food. Chem*, 49(9), 4168-4170.
- Ayari S., Dussault D., Millette M., Hamdi M., Lacroix M. (2010). Response of *Bacillus cereus* to gamma-irradiation in combination with carvacrol or mild heat treatment. *J Agric Food Chem*, 58(14), 8217-24.
- Bakker E., Mangerich W.E. (1981). Interconversion of components the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J Bacteriol*, 147(3), 820-826.
- Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchikhi T., Remmal A. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol*, 38(6), 454-458.
- Chami F., Chami N., Bennis S., Bouchikhi T., Remmal A. (2005a). Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res*, 19(5), 405-408.
- Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A., Remmal A. (2005b). Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral. Microbiol. Immunol*, 20(2), 106-111.
- Chapaval L., Moon D.H., Gomes J.E., Duarte F.R., Tsai S.M. (2008). An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 60(2), 299-306.
- Chen T.R., Hsiao M.H., Chiou C.S., Tsen H.Y. (2001). Development and use of primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol*, 71(1), 63-70.
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol*, 29(2), 130-135.
- Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., Trombetta D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem*, 55(15), 6300-6008.
- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem*, 55(12), 4863-4870.

- Dyer D.W., Iandolo J.J. (1983). Rapid isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol*, 46(1), 283-285.
- Ezzaouia S., Chami N., Chami F., Bennis S., Filali-Maltouf A., Remmal A. (2007). Investigation of essential oils to fight multiresistant bacteria in hygienic and therapeutic applications. *Int. J. Essent. Oil. Therap*, 1, 51-55.
- Fidalgo S., Vasquez F., Mendoza M.C., Perez F., Mendez F.J. (1990). Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev. Infect. Dis*, 12(3), 520-528.
- Grundmann H., Hori S., Enright M.C., Webster C., Tami A., Feil E.J., Pitt T. (2002). Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing. *J. Clin. Microbiol*, 40(12), 4544-4546.
- Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.M.G., Von Wright A. (1998). Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food. Chem*, 46(9), 3590-3595.
- Hiramatsu K., Asada K., Suzuki E., Okonogi K., Yokota T. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett*, 298(2-3), 133-136.
- Holmes A., Ganner M., McGuane S., Pitt T.L., Cookson B.D., Kearns A.M. (2005). *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J. Clin. Microbiol*, 43(5), 2384-2390.
- Louaste B., Bouddine L., Eloutassi N., Remmal A. (2012). A simple and rapid lysis method for preparation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. *Afr. J. Biotechnol*, 11(70), 13447-13450.
- Marmur J. (1963). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol*, 3(2), 208-218.
- Martineau F., Picard F.J., Ke D., Paradis S., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G. (2001). Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J. Clin. Microbiol*, 39(7), 2541-2547.
- Martineau F., Picard F.J., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G. (1998). Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*, 36(3), 618-623.
- Navarre W.W., Schneewind O. (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 63(1), 174-229.

- Orwin P.M., Fitzgerald J.R., Leung D.Y.M., Gutierrez J.A., Bohach G.A., Schlievert P.M. (2003). Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect. Immun*, 71(5), 2916-2919.
- Pol I.E., Smid E.J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29(3), 166-170.
- Rao A., Zhang Y., Muend S., Rao R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(12), 5062-5069.
- Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M., Tantaoui-Elaraki A. (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Essent. Oil. Res*, 5(2), 179-184.
- Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Sendide K., Remmal A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oil Res*, 15(5), 356-362.
- Rosec J.P., Guiraud J.P., Dalet C., Richard N. (1997). Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food, Microbiol.* 35(3), 213-221.
- Salton M.R.J. (1952). Cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme. *Nature*, 170(4331), 746-747.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shafer W.M., Iandolo J.J. (1979). Genetics of staphylococcal enterotoxin B in methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun*, 25(3), 902-911.
- Sheagren J.N. (1984). *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen. *N. Engl. J. Med.* 310(21), 1368-1373.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49(6), 2474-2478.
- Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R. 2002, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Env. Microbiol*, 68(4), 1561-1568.
- Ultee A., Gorris L.M.G., Smid E.J. (1998). Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus*. *J. Appl. Microbiol*, 85(2), 211-218.
- Xu J., Zhou F., Ji B.P., Pei RS, Xu N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol*, 47(3), 174–179.