

Timol smanjuje pokretljivost bakterija inkorporacijom u bakterijske ćelijske membrane

Sekundarni metaboliti biljaka iskazuju široku paletu bioloških aktivnosti, među kojima se izdvajaju antibakterijska, antiviralna i antifungalna aktivnost. Prethodna istraživanja su pokazala da predstavnici klase monoterpenoidnih fenola, kao što su eugenol, timol i karvakrol, pokazuju snažnu antibakterijsku aktivnost, pri čemu je mehanizam njihovog delovanja još nepoznat. Pretpostavlja se da se navedeni molekuli, zbog svoje hidrofobne prirode, inkorporiraju u fosfolipidni dvosloj i menjaju pasivnu permeabilnost membrane usled narušavanja njenih tečno-kristalnih osobina, na taj način dovodeći do izlaska jona i esencijalnih metabolita u vanćelijsku sredinu. U ovom radu je praćena inkorporacija molekula timola u bakterijske ćelijske membrane, kao i promena protonske motorne sile bakterijskih ćelija. Inkorporacija molekula timola je detektovana masenom spektrometrijom, dok je promena protonske motorne sile posredno određena praćenjem pokretljivosti bakterija, kao i pH vrednosti i konduktiviteta vanćelijske sredine. Rezultati masene spektrometrije ukazuju na prisustvo timola u ćelijskim membranama nakon eksperimentalnog tretmana, dok rezultati eseja pokretljivosti pokazuju koncentracionozavisan trend opadanja pokretljivosti bakterijskih ćelija usled inkorporacije timola u ćelijske membrane. Rezultati ovog istraživanja su među prvim pokazali povezanost inkorporacije molekula timola u bakterijske ćelijske membrane sa padom motiliteta bakterijskih ćelija i značajni su za dalji tok određivanja molekularnog mehanizma antibakterijskog dejstva ovog molekula.

Uvod

Sekundarni metaboliti velikog broja biljaka pokazuju širok spektar biološkog dejstva, među kojima je naročito izraženo antibakterijsko, antifungalno i antiviralno dejstvo (Lis-Balchin *et al.* 1999). Među sekundarnim metabolitima biljaka posebno se izdvaja klasa monoterpenoidnih fenolnih molekula, malih organskih jedinjenja, koji se sastoje od aromatičnog jezgra za koje su vezane dve izoprenske jedinice i hidroksilna grupa (Hyldgaard *et al.* 2012). Predstavnici monoterpenoidnih fenola koji su se izdvojili u

*Zorica Sofilj (1996),
Novi Sad, Proleterska
3, učenica 4. razreda
Medicinske škole
„7. april” u Novom
Sadu*

MENTORI:

*Aleksej Drino,
Biološki fakultet
Univerziteta u
Beogradu*

*Stefan Maksimović,
Medicinski fakultet
Univerziteta u
Beogradu*

pređašnjim istraživanjima su timol, eugenol i karvakrol, za koje je pokazano da iskazuju snažno antibakterijsko dejstvo (Lambert *et al.* 2001). Prethodne studije u ovom polju su pokazale da se karvakol, zahvaljujući svojim osobinama lipofilnosti, inkorporira u lipidni dvosloj membrana bakterijskih ćelija i narušava njenu tečno-kristalnu strukturu, čineći je samim tim permeabilnom za unutarćelijski sadržaj (Helander *et al.* 1998). Posledica ovako indukovane povećane permeabilnosti membrane može podrazumevati izlazak jona i esencijalnih metabolita u vanćelijsku sredinu i, dalje, imati brojne posledice po vijabilnost bakterijske ćelije. Među jonima koji napuštaju unutrašnjost bakterijske ćelije su i vodonikovi joni (protoni), što za posledicu ima narušavanje protonske motorne sile (PMS). PMS je esencijalna za brojne biološke fenomene bakterija, među kojima se nalazi i funkcionisanje specijalizovanih proteinskih struktura za kretanje – flagela (Ultee *et al.* 2000). U osnovi flagela se nalazi proteinski kompleks, sličan motoru, lociran sa unutrašnje strane ćelijske membrane. Transport protona kroz specijalizovane strukture ovog proteinskog motora uzrokuje pretvaranje elektrohemijskog gradijenta protona u kinetičku energiju rotacije flagela bakterijskih ćelija, dovodeći samim tim do njihovog kretanja (Minamino *et al.* 2008).

Prethodna istraživanja su pokazala da timol, prvobitno izolovan iz majčine dušice (*Thymus serpyllum*), ima jako antibakterijsko dejstvo. Međutim, molekularni mehanizam antibakterijske aktivnosti ovog jedinjenja nije u potpunosti poznat. Struktura timola je veoma slična strukturi karvakrola, pri čemu je položaj izoprenske grupe timola na 2. ugljenikovom atomu, a karvakrola na 3. ugljenikovom atomu aromatičnog jezgra (Shekarchi *et al.* 2010). Shodno navedenim činjenicama, može se pretpostaviti da timol ispoljava svoju aktivnost preko povećavanja pasivne permeabilnosti membrane i gubitka esencijalnih metabolita iz bakterijske ćelije.

Cilj ovog rada je da se, praćenjem sastava ćelijske membrane *E. coli*, pokretljivosti bakterija, kao i promene fizičko-hemijjskih parametara spoljašnje sredine, ispita povezanost inkorporacije molekula timola u bakterijske ćelijske membrane sa promenama u PMS bakterijskih ćelija. Ovi rezultati su bitni za dalji tok određivanja molekularnog mehanizma antibakterijskog dejstva molekula timola.

Materijal i metode

U svrhu testiranja gore navedene hipoteze, primenjene su standardne metode ispitivanja motiliteta bakterijskih ćelija, kao i merenja konduktiviteta i pH vrednosti vanćelijske sredine, dok su postojeći protokoli izolacije ćelijskih membrana modifikovani u svrhu precizne detekcije molekula timola masenom spektrometrijom.

Materijali

Istraživanje je vršeno na *E. coli* gajenoj u LB podlozi (kazein hidrolizat – 10 g, NaCl – 5 g, ekstrakt kvasca – 5 g, za 1 L podloge). Timol je rastvoren u dimetilsulfoksidu (DMSO) i finalna koncentracija timola u različitim eksperimentalnim grupama je iznosila 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, pri čemu su koncentracije preuzete iz pređašnjih studija minimalne inhibitorne koncentracije molekula timola (Burt 2004). Tretman timolom je trajao 12 h, dok je kontrolna grupa gajena u netretiranoj LB podlozi, kao i u LB podlozi sa 0.2% DMSO. Bakterije su gajene na uslovima od 37°C. Tretmani bakterija su vršeni tokom eksponencijalne faze rasta populacije da bi se izbegla letalnost timola u ranim fazama rasta bakterijske populacije.

Metode

Detekcija timola u membranama. U svrhu testiranja inkorporacije molekula timola u ćelijske membrane bakterija korišćena je kombinacija postojećih protokola diferencijalnog centrifugiranja ćelijskih lizata i masene spektrometrije izolovanih membrana, uz prilagođavanje potrebama ovog istraživanja.

Bakterijske ćelije su tretirane timolom u finalnim koncentracijama od 0.1, 0.2, 0.4 i 0.8 mg/mL. Nakon tretmana ćelije su centrifugirane na 5000 rpm 10 minuta. Po završetku centrifugiranja supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 2 mL destilovane vode. U svaki uzorak je dodat lizozim u finalnoj koncentraciji od 0.2 mM i inkubiran na ledu 30 minuta. Nakon inkubacije dodato je 15 mL pufera za lizu ćelija (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 50 mM TRIS i 1 mM EDTA), nakon čega su uzorci centrifugirani na 35000 g 30 minuta na 4°C. Supernatant je odliven, nakon čega je celokupan postupak ponovljen radi boljeg odvajanja ćelijskih membrana od citosolne frakcije liziranih bakterijskih ćelija. Nastali pelet je resuspendovan u 2 mL pufera za lizu, u koji je dodato 5 µL proteinaze K. Uzorci su ponovo centrifugirani na 35000 g u plastičnim vafnama 15 minuta, nakon čega je supernatant odliven, a pelet ponovo resuspendovan u 2 mL pufera za lizu. Radi fazne ekstrakcije nepolarnih molekula timola od amfipatičnih molekula fosfolipida, dobijena membranska frakcija je tretirana visoko nepolarnim organskim rastvaračima u višku, tj. sa 6 mL petroletra. Nakon 20 minuta centrifugiranja na 4000 rpm organska faza je sakupljena, dok je vodena faza, koja sadrži fosfolipidne molekule, odbačena. Dodat je anhidrovan MgSO₄ u svrhu skupljanja eventualno zaostale vode, a zatim je izvršena filtracija, nakon čega je filtrirani sadržaj uparen do suva i rastvoren u metilen-hloridu. Tako pripremljeni uzorci su naneti na gasnu hromatografiju spojenu sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Korišćen je Agilent Technologies 7890A gasni hromatograf sa Agilent Technologies 240 Ion Trap masenim spektrometrom (EI jonizacija, sa energijom elektrona od 70 eV, 40–1000 m/z). Korišćena je VF5MS kolona (30 m × 250 µm × 0.2 µm) i helijum kao noseći gas pri protoku od 1

mL/min. Početna temperatura stacionarne faze je iznosila 40°C, a zatim je povećana na 310°C, brzinom od 7°C/min, i na toj temperaturi zadržana 10 minuta. Ukupno snimanje je trajalo 48 minuta.

Merenje pH i konduktiviteta. U cilju detekcije povećanja permeabilnosti membrana bakterijskih ćelija, kao i kretanja protona niz svoj elektrohemijski gradijent ka vanćelijskoj sredini, promene u pH vrednosti i konduktivitetu vanćelijske sredine su praćene standardnim metodama.

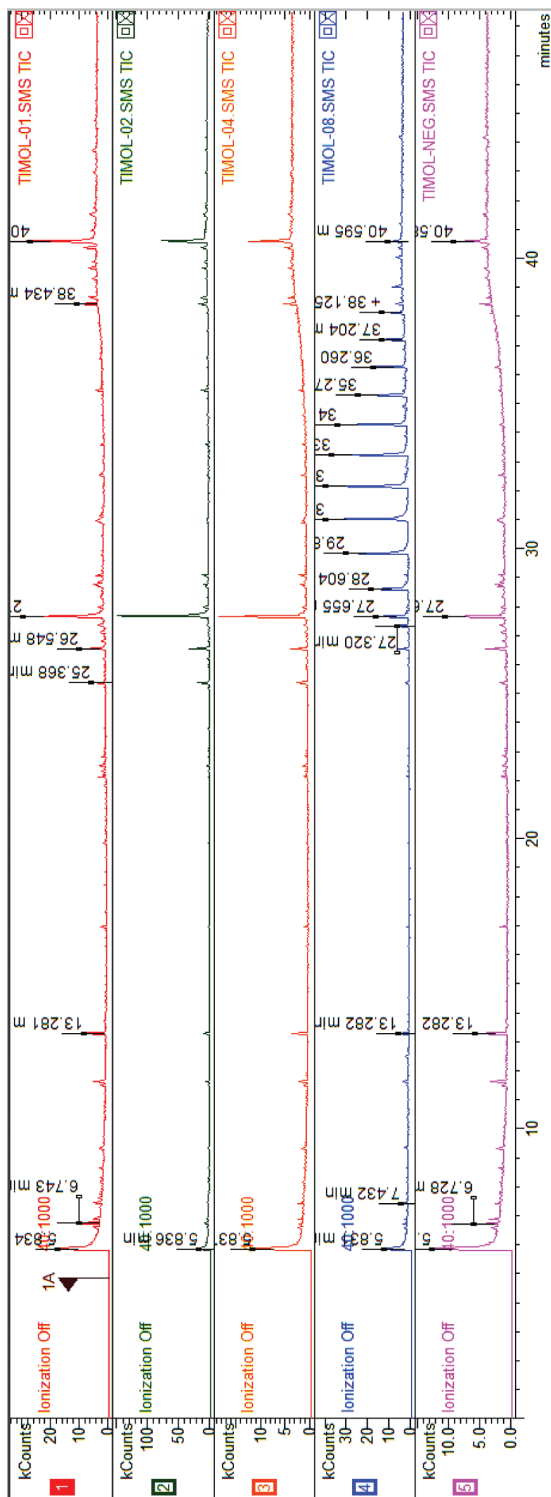
Ćelije su tretirane timolom u eksponencijalnoj fazi rasta populacije (4h nakon zasejavanja), u finalnim koncentracijama od 0.1, 0.2, 0.4 i 0.8 mg/mL. Nakon 12 h tretmana, izmerene su vrednosti pH i konduktiviteta. Izvršeno je precizno merenje parametara vanćelijske sredine kontrolne grupe usled mogućnosti smanjenja pH vrednosti sredine, koja može da se javi kao posledica metaboličke aktivnosti bakterijskih ćelija.

Test pokretljivosti. Promene u permeabilnosti membrane mogu dovesti do pada elektrohemijskog gradijenta jona bitnih za biološke aktivnosti bakterijskih ćelija, kao što su vodonikovi joni (H^+), pri čemu može doći do smanjenja PMS bakterijskih ćelija. Smanjenje PMS sa sobom povlači i smanjenje pokretljivosti bakterija, usled zavisnosti rada flagelarnih bazalnih motornih proteina od potencijalne energije protonskog gradijenta. Pokretljivost bakterija je moguće kvantifikovati korišćenjem testova pokretljivosti (engl. Motility test).

Test pokretljivosti bakterija je izvršen inokulacijom bakterijskih ćelija na LA podloge sa koncentracijom agra od 0.3% i dodatim različitim eksperimentalnim koncentracijama timola. Inokulacija bakterija je izvršena u srednji sloj (polovina ukupne dubine agra) u dve odvojene tačke. Inkubacija bakterija u odgovarajućim koncentracijama timola je trajala 24 h, nakon čega su mereni prečnici izraslih kolonija. S obzirom na to da su kolonije nepravilnog oblika, za merenje su izabrane najduže razdaljine krajeva kolonije, po standardnom protokolu za merenje zone rasta.

Rezultati

Kao posledica delovanja molekula timola na bakterijske ćelije može se javiti povećana permeabilnost membrane. U cilju ispitivanja prisustva timola u ćelijskim membranama nakon eksperimentalnog tretmana, izvršena je izolacija membranske frakcije centrifugiranjem ćelijskog sadržaja na različitim brzinama, ne bi li se izvršilo razdvajanje najpre težih (organele), a zatim lakših ćelijskih komponenti (membrane). Analiza membranskog sadržaja je izvršena gasnom hromatografijom spojenom sa masenom spektrometrijom. Rezultati su prikazani na hromatogramima, na slici 1. Slika 1 prikazuje snimljen celokupan spektar za svaki uzorak bakterija tretiranih koncentracijama: 0.1 mg/mL (spektar 1), 0.2 mg/mL (spektar 2), 0.4 mg/mL (spektar 3), 0.8 mg/mL (spektar 4) i kontrola, koja predstavlja netretirane bakterije (spektar 5)

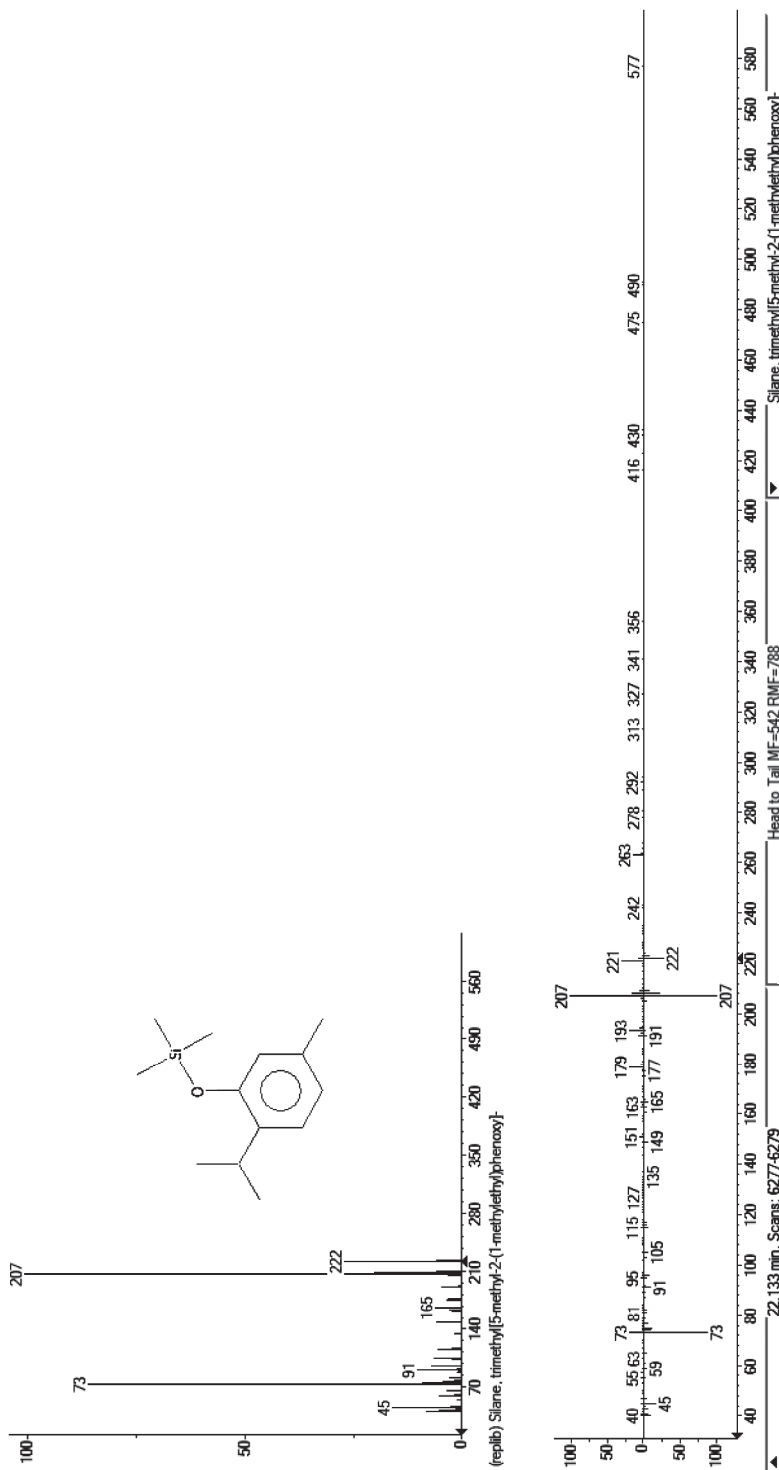


Slika 1.

Prikaz celokupnih spektara svih uzoraka. Hromatogrami predstavljaju celokupan spektar za svaki uzorak bakterija tretiranih odgovarajućim koncentracijama timola: Spektar 1 je za uzorak bakterija tretiranih koncentracijom timola od 0.1mg/mL, spektar 2 je za uzorak bakterija tretiran koncentracijom timola 0.2 mg/mL, spektar 3 je za uzorak bakterija tretiranih koncentracijom timola od 0.4 mg/mL, spektar 4 je za uzorak bakterija tretiranih koncentracijom timola od 0.8 mg/mL, a spektar 5 predstavlja negativnu kontrolu.

Figure 1.

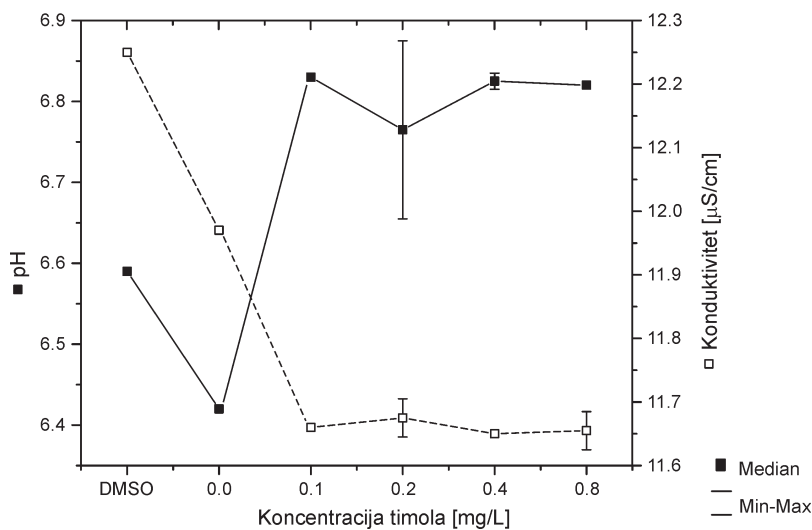
Display of complete spectra of all samples. The chromatograms represent the full spectrum for each sample of bacteria treated with appropriate concentrations of thymol: spectrum 1 represents the sample of bacteria treated with thymol concentration of 0.1 mg/mL, spectrum 2 represents the sample of bacteria treated with thymol concentration of 0.2 mg/mL, spectrum 3 represents the sample of bacteria treated with thymol concentration of 0.4 mg/mL, spectrum 4 represents the sample of bacteria treated with thymol concentration of 0.8 mg/mL and spectrum 5 represents negative control group.



Slika 2.
 Jedinjenje
 registrovano na
 retencionom vremenu
 22.133 minuta u
 eksperimentanoj grupi
 tretiranoj timolom
 koncentracije
 0.1 mg/mL. Ostali
 detektovani pikovi
 predstavljaju
 fragmente fosfolipida
 i steroida koji ulaze u
 sastav membrane
 Gram-negativnih
 bakterija.

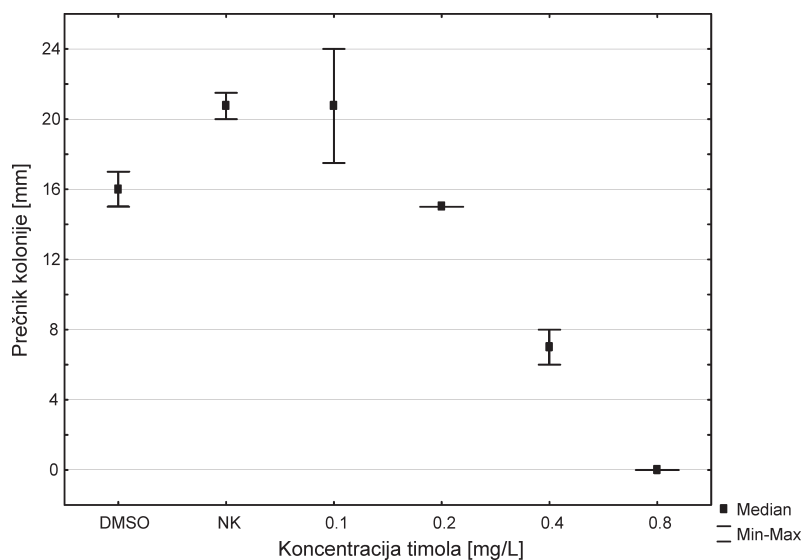
Figure 2.
 Compound detected at
 retention time 22.133
 minutes in
 experimental group
 treated with a thymol
 concentration of
 0.1 mg/mL. The other
 peaks represent
 fragments of
 phospholipids and
 steroids which are
 included in the
 membrane of Gram
 negative bacteria.

Slika 2 prikazuje jedinjenje registrovano na retencionom vremenu 22.133 minuta u uzorku tretiranom timolom koncentracije 0.1 mg/mL. Veoma je bitno napomenuti da su posredstvom masene spektrometrije detektovani i fragmenti fosfolipidnih i steroidnih molekula koji ulaze u sastav ćelijske membrane bakterijskih ćelija. U uzorcima bakterija tretiranih koncentracijama 0.1 mg/mL (spektar 1), 0.2 mg/mL (spektar 2), 0.4 mg/mL (spektar 3) i uzorku negativne kontrole (spektar 5) fragmenti fosfolipidnih i steroidnih molekula su detektovani na retencionim vremenima: 25.368, 26.548 i 27.655 minuta, dok je za uzorak bakterija tretiranih koncentracijom timola 0.8 mg/mL (spektar 4) detektovano na retencionim vremenima pikova od 27.320 do 38.126 minuta (slika1).



Slika 3.
Vrednosti pH i konduktiviteta u različitim eksperimentalnim grupama

Figure 3.
Values of pH and conductivity in different experimental groups



Slika 4.
Zavisnost prečnika izraslih kolonija od koncentracije timola

Figure 4.
Thymol inhibits bacterial motility by being incorporated in their cell membrane

Usled povećane permeabilnosti membrane može doći do kretanja protona niz elektrohemijski gradijent, te je u tu svrhu merena promena konduktivnosti i pH vrednosti vanćelijske sredine nakon dodavanja različitih koncentracija timola. Rezultati su prikazani na slici 3.

Povećana permeabilnost membrane i posledično smanjenje protonске motorne sile bakterijskih ćelija se može odraziti na njihovu pokretljivost. U svrhu ispitivanja ove pojave, izvršeni su testovi pokretljivosti, u kojima je merena pokretljivost bakterijskih ćelija nakon tretmana timolom različitih koncentracija, DMSO i kontrolnih grupa. Rezultati merenja motiliteta pokazuju jako izraženu zavisnost prečnika kolonija od koncentracije timola (slika 4).

Diskusija

Sve češća je pojava bakterijskih populacija rezistentnih na široko dostupne antibiotike. Ovaj problem primorava naučnu javnost da kontinuirano traga za novim izvorima biocida sa širokim spektrom delovanja (Burt 2004). U poslednje vreme veliko interesovanje je usmereno ka istraživanju biocidnih potencijala sekundarnih metabolita aromatičnih biljaka. Aromatične biljke su najčešće poznate u lokalnim farmakopejama po njihovom spektru bioloških aktivnosti, među kojima se izdvajaju antiseptično, antioksidativno, sedativno, antiinflamatorno i spazmolitičko, pri čemu je pokazano da njihovi sekundarni metaboliti inhibiraju rast bakterija ili u potpunosti ubijaju bakterijske ćelije (Burt *et al.* 2003). Najsnažniju antibakterijsku aktivnost iskazuju sekundarni metaboliti fenolne prirode, poput karvakrola, timola i eugenola (Burt 2004).

Antibakterijsko dejstvo timola na ćelije *E. coli* je već pokazano u prethodnim studijama (Cosentino *et al.* 1999), pri čemu je tačan mehanizam njegovog delovanja ostao nepoznat (Burt *et al.* 2003). U skladu sa njegovom strukturom, pretpostavljeno je da se njegova aktivnost iskazuje preko interferiranja sa strukturom ćelijske membrane i/ili narušavanja protonске motorne sile, transporta elektrona i aktivnog transporta komponenti metaboličkih puteva bakterijske ćelije (Burt 2004). Prethodne studije su pokazale da timol dovodi do permeabilizacije ćelijske membrane (Lambert *et al.* 2001) na način koji ne podrazumeva destabilizaciju ćelijske membrane koordinativnim vezivanjem katjona bitnih za stabilizaciju proteoglikana ćelijskog zida bakterijske ćelije (Helander *et al.* 1998). Studije na Gram-pozitivnim bakterijama, kao što je *Bacillus cereus*, pokazale su da strukturni izomer timola, karvakrol, direktno interaguje sa ćelijskim membranama i pozicionira se između lanaca masnih kiselina (Ultee *et al.* 2000). Ovakvo pozicioniranje molekula karvakrola dovodi do ekspanzije i destabilizacije membrane, povećavajući njenu fluidnost i pasivnu permeabilnost (Ultee *et al.* 2002), što je upravo i pokazano merenjima temperature faznih prelaza bakterijskih ćelijskih membrana tretiranih timolom (Ultee *et al.* 2000; Trombetta *et al.* 2005). Navedenim rezultatima koji potvrđuju interakcije molekula timola sa bakterijskim ćelijskim membranama se pridružuju i rezultati našeg istraživanja, dobijenih analizom

izolovanih membrana *E. coli* nakon eksperimentalnog tretmana različitim koncentracijama timola. Kao što se može videti sa slike 1, na spektrima masene spektrometrije su detektovani pikovi masnih kiselina specifičnih za ćelijske membrane bakterija, što potvrđuje uspešnost izolacije membranske frakcije bakterijskih ćelija. Ovom analizom je detektovano jedinjenje sa strukturom timola na retencionom vremenu 22.133 minuta (slika 2). Na slici 2 se vidi da je detektovan molekul timola, kod koga je hidroksilna grupa derivatizovana silaniziranjem. Međutim, analiza uzoraka tretiranih koncentracijom od 0.8 mg/mL na retencionom vremenu 22.133 minuta ne pokazuje prisustvo timola, što zahteva dalja istraživanja na temu koncentraciono-zavisne inkorporacije molekula timola u bakterijske ćelijske membrane.

Prethodna istraživanja pasivne permeabilizacije bakterijskih membrana u prisustvu karvakrola su pokazala da u njegovom prisustvu dolazi do smanjenja koncentracije ATP molekula unutar ćelije *B. cereus*, do oštrog pada membranskog potencijala, PMS i pH gradijenta membrane *B. cereus*, kao i pada u gradijentu jona natrijuma unutar i van bakterijske ćelije (Ultee *et al.* 1999). Naše merenje permeabilizacije membrane *E. coli*, posredstvom merenja promene pH vrednosti vanćelijske sredine, nije dalo rezultate koji se slažu sa gorepomenutim studijama. Nepostojanje promene u pH vrednosti i konduktivitetu spoljašnje sredine kod različitih eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu grupu se može objasniti činjenicom da je efekat molekula timola bio ograničen spoljašnjom membranom Gram-negativnih bakterija usled negativnog naelektrisanja i hidrofilitnosti lipopolisaharidnih molekula (Dorman i Deans 2000; Trombetta *et al.* 2005; Ikgai *et al.* 1993; Hancock 1997) ili nedovoljnom osetljivošću pH elektrode i konduktometra. U cilju boljeg razumevanja ovog fenomena, preporučujemo korišćenje osetljivijih metoda u daljim istraživanjima promena fizičko-hemijskih parametara vanćelijske sredine bakterijskih ćelija tretiranih timolom. S druge strane, naše merenje pada PMS posredstvom praćenja kretanja bakterijskih ćelija pokazuje koncentraciono zavisan trend opadanja pokretljivosti bakterijskih ćelija nakon eksperimentalnog tretmana. Pređašnje studije bakterijske pokretljivosti su rađene isključivo pod tretmanom bakterija molekulima karvakola, pri čemu je pokazano da bakterijski motilitet opada upravo usled karvakol-indukovanog pada PMS bakterijske ćelije (Gabel *et al.* 2003). Ovaj podatak čini našu studiju utoliko značajnijom, pošto su naši rezultati među prvima pokazali pad bakterijskog motiliteta usled interferencije molekula timola sa bakterijskim ćelijskim membranama. Rezultatima koji potvrđuju interakcije molekula timola sa bakterijskim ćelijskim membranama se pridružuju i rezultati studije Juvena i saradnika (Juven *et al.* 1994), koji su pokazali da molekul timola iskazuje veći inhibitory potencijal na bakterijske ćelije na pH sredine 5.5 nego na pH 6.5 usled protonovanja njegovih grupa – izoprenske i hidroksidne – i povećane hidrofobnosti molekula.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju, kao i rezultati prethodnih istraživanja mehanizama antibakterijskog dejstva timola i njemu sličnih molekula, idu u prilog našoj hipotezi da timol pomoću hidrofoničkih interakcija sa

fosfolipidnim molekulima membrane, kao i membranskim proteinima, dovodi do narušavanja tečno-kristalnih osobina ćelijske membrane i njene pasivne permeabilizacije. Ovako indukovana pasivna permeabilizacija bakterijske membrane može dovesti do izlaska esencijalnih jona i metabolita u vanćelijsku sredinu (dominantno jona K^+ i molekula ATP) i narušavanja životnih procesa bakterijske ćelije. Naravno, ne možemo da isključimo mogućnost da se interakcije timola sa drugim komponentama bakterijske ćelije nalaze u osnovi njegove antibakterijske aktivnosti. Pređašnje studije su pokazale da antibakterijska aktivnost određenih površinskih aktivnih hidrofobnih molekula ne zavisi od interakcija sa bakterijskom ćelijskom membranom. Vrlo je moguće da monoterpenoidni molekuli mogu ući u permeabilizovane bakterijske ćelije i intereagovati sa unutarćelijskim strukturama, što je mehanizam dejstva pretpostavljen za molekule linil-acetata (Trombetta *et al.* 2002; Glover *et al.* 1999; Trombetta *et al.* 2005). Takođe, jedan od mogućih modela antibakterijske aktivnosti hidrofobnih molekula sa hidroksilnom grupom je da služe kao transmembranski prenosiooci monovalentnih katjona, prenoseći K^+ jone u vanćelijsku sredinu (Ulte *et al.* 2002).

Zaključak

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da se molekuli timola, zbog svoje hidrofobne prirode, inkorporiraju u fosfolipidni dvosloj Gram-negativnih bakterija i da se kao posledica tog inkorporiranja javlja smanjena pokretljivost bakterijskih ćelija. Takođe, izolacija ćelijskih membrana bakterije pokazana gasno-masenom spektrometrijom potvrđuje validnost korišćene metode, te se ona preporučuje u daljim istraživanjima.

Smernice ka daljim istraživanjima mogu podrazumevati ispitivanje antibakterijske aktivnosti molekula timola u zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina spoljašnje membrane različitih Gram-negativnih bakterija, kao i hemijskog sastava citoplazmatične membrane datih bakterija, dok bi takođe bilo pogodno ispitati interakcije fenolnih sekundarnih metabolita biljaka sa unutarćelijskim komponentama bakterijske ćelije.

Zahvalnost. Zahvaljujem se svom mentoru Stefanu Maksimoviću na pomoći tokom pripreme i realizacije rada, stručnom saradniku Alekseju Drino na stručnoj pomoći i savetovanju tokom realizacije i pisanja ovog rada, kao i Ivani Vujković na pomoći tokom realizacije rada. Posebno se zahvaljujem Alekseju Drino i Ivani Vujković što su, koristeći svoje znanje i iskustvo, formirali protokol za izolaciju ćelijskih membrana primenjen u ovom radu.

Literatura

- Burt S., Reinders R. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, **36** (3): 162.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94** (3): 223.
- Cosentino S., Tuberoso C., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, **29**: 130.
- Dorman H., Deans S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88** (2): 308.
- Gabel C. V. Berg H. C. 2003. The speed of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* varies linearly with proton motive force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**: 8748.
- Glover R., Smith R., Jones M., Jackson S., Rowlands C. 1999. An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. *FEMS Microbiology Letters*, **177** (1): 57.
- Hancock R. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology*, **5** (1): 37.
- Helander I., Alakomi H., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E., Gorris L., Von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 3590.
- Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R. 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, **3**: 1.
- Ikigai H., Nakae T., Hara Y., Shimamura T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **1147** (1): 132.
- Juven B., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, **76** (6): 626.
- Lambert R., Skandamis P., Coote P., Nychas G. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 453.
- Lis-Balchin M., Hart S. 1999. Studies on the mode of action of the essential oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytotherapy Research*, **13** (6): 540.

- Minamino T., Imada K., Namba K. 2008. Molecular motors of the bacterial flagella. *Current Opinion in Structural Biology*, **18** (6): 693.
- Shekarchi M., Khanavi M., Adib N., Amri M., Hajimehdipoor H. 2010. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Magazine*, **6** (23): 154.
- Trombetta D., Saija A., Bisignano G., Arena S., Caruso S., Mazzanti G., Uccella N., Castelli F. 2002. Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Letters in Applied Microbiology*, **35** (4): 285.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M., Venuti V., Cristan M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. 2005. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49** (6): 2474.
- Ultee A., Kets E., Smid E. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 4606.
- Ultee A., Kets E., Alberda M., Hoekstra F., Smid E. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, **174** (4): 233.
- Ultee A., Bennik M., Moezelaar R. 2002. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (4): 1561.

Zorica Sofilj

Thymol Inhibits Bacterial Motility by Being Incorporated in their cell Membrane

Secondary metabolites of various plants express a wide variety of biological activities, some of which are antibacterial, antiviral and antifungal. Past studies have shown that representatives of a monoterpenoid phenol class, such as eugenol, thymol and carvacrol, express strong antibacterial activity, whereas the mechanism of their action still remains unknown. Previous studies have implied that these molecules, due to their hydrophobicity, incorporate into the phospholipid bilayer and change membrane permeability due to the disruption of its liquid-crystalline properties, leading to the release of ions and essential metabolites. This study evaluated the incorporation of thymol molecules in the bacterial cell membrane, as well as changes in the proton motive force of bacterial cells. The bacteria were treated with thymol in concentrations of 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL,

0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL and the incorporation of the molecules of thymol was detected by mass spectrometry, whereas the change of the proton motive force was determined by the changes in bacterial motility, as well as the pH and the conductivity of the extra-cellular environment. Results of mass spectrometry confirmed the presence of thymol in cell membranes after experimental treatment, while results of motility assays show a concentration-dependent trend of motility decrease due to the incorporation of thymol in the cell membrane. The results of this research are important for the further determining of molecular mechanism of antibacterial effect of hydrophobic secondary metabolites of plants, with implications for use in pharmacology.

