

بررسی تأثیر اسانس *Rosmarinus officinalis* L. بر رشد و بیان ژنی انتروتوکسین‌های A، C و E استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213

مریم عزیزخانی^{۱*}، رزا ازنا^۲ و پاتریسیا الیزاکویویل^۳

* نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، ایران

پست الکترونیک: azizkhani.maryam@gmail.com

۲- استاد، گروه میکروبیولوژی و اکولوژی، دانشگاه والنسیا؛ و گروه بیوتکنولوژی، انستیتو آگروشیمی و تکنولوژی مواد غذایی، والنسیا، اسپانیا

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی و اکولوژی دانشگاه والنسیا، والنسیا، اسپانیا

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۳

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۲

چکیده

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی به علت مصرف مواد غذایی که در آن استافیلوکوکوس انتروتوکسیژنیک رشد و تولید انتروتوکسین کرده است، رخ می‌دهد. هدف قرار دادن فاکتورهای بیماری‌زایی باکتریایی، در حال حاضر به‌عنوان یک راهبرد جایگزین برای توسعه انواع جدیدی از مواد نگهدارنده ضدمیکروبی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران و محققان صنایع غذایی قرار گرفته است. هدف این تحقیق بررسی تأثیر اسانس *Rosmarinus officinalis* L. (رزماری) بر رشد و بیان ژنی انتروتوکسین‌های A، C و E استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 می‌باشد. در این مطالعه پس از تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد، رشد باکتری و ترشح SEA، SEC و SEE تحت تأثیر غلظت‌های بازدارنده اسانس رزماری (به روش ELISA) ارزیابی شد. علاوه بر این، تأثیر اسانس بر نسخه‌برداری ژن‌های *sec*، *sea* و *see* (ژن‌های کدکننده SEA، SEC و SEE) با استفاده از PCR نیمه کمی بررسی شد. اسانس Ros در غلظت MIC ۷۵٪ رشد باکتری را به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش داد. همچنین، اسانس از نسخه‌برداری ژن‌های *sea*، *sec* و *see* بازدارندگی نمود و باعث کاهش ترشح SEA، SEC و SEE شد. غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس تولید انتروتوکسین را در روند وابسته به دوز کاهش دادند. بنابراین داده‌های این مطالعه پیشنهاد می‌کند که اسانس رزماری می‌تواند به‌عنوان نگهدارنده طبیعی به‌منظور بازدارندگی رشد و تولید انتروتوکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس در صنایع غذایی بکار رود.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین، بیان ژنی، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.).

مقدمه

دردهای پیچشی شکمی و اسهال بوده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت به طول می‌انجامد. با وجود اینکه بیماری خفیف و خود محدودشونده بوده و میزان مرگ و میر در این نوع مسمومیت پایین است، اما به‌عنوان یکی از مهمترین مسمومیت‌ها، از لحاظ بهداشتی-اقتصادی، در سراسر جهان محسوب می‌شود (Su &

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی به علت مصرف مواد غذایی یا آشامیدنی حاوی یک یا چند انتروتوکسین استافیلوکوکی (SE) تولید شده توسط گونه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس رخ می‌دهد. علائم مسمومیت شامل تهوع، استفراغ،

اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بر بیان ژنی میکروارگانیزم‌ها انجام شده‌است. شناخت مکانیسم عملکرد این ترکیب‌ها بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس راهکاری بدیع برای کنترل زیستی این باکتری بدون استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی و آنتی‌بیوتیک‌هاست، زیرا این ترکیب‌ها باعث اختلال در اکوسیستم باکتریایی و ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک که از نگرانی‌های عمده در بهداشت عمومی است، می‌شوند (Tassou *et al.*, 2000; Smith-Palmer *et al.*, 2001).

Rosmarinus officinalis L. گیاهی متعلق به خانواده Labiatae است. در پژوهش‌هایی که در ارتباط با ترکیب شیمیایی اسانس رزماری انجام شده، آلفا-پینن به‌عنوان ترکیب اصلی گزارش شده و پس از آن به ترتیب ۸،۱-سینئول، کامفن، بتا-میرسین، کامفور و بورتئول عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس رزماری را تشکیل می‌دهند (Moghtader & Afzali, 2009; Jamshidi *et al.*, 2009). در برخی مطالعات نیز ۸،۱-سینئول به‌عنوان ترکیب اصلی گزارش شده‌است (Fu *et al.*, 2007a; Fu *et al.*, 2007b; Debersac *et al.*, 2001).

در این مطالعه، تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده رشد اسانس رزماری بر رشد و نیز بیان ژنی انتروتوکسین‌های A، C و E استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

گیاه رزماری

برگ و سرشاخه‌های هوایی گیاه از پژوهشکده گیاهان دارویی کرج تهیه و تا زمان استفاده به‌صورت خشک شده (خشک شده با استفاده از هوای گرم) نگهداری شد.

استخراج اسانس و آنالیز آن

اسانس از سرشاخه‌های هوایی خشک شده گیاه به روش تقطیر با آب (Hydro Distillation) با سیستم Clevenger (به مدت ۲ ساعت) استخراج شد. پس از تهیه اسانس، آنالیز ترکیب‌های شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Trace GC 2000 FINNIGAN

Rosec & Balaban & Rasooly, 2000; Wong, 1997; Gigaud, 2002; Hennekinne *et al.*, 2009). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوی پس از ورود به روده، عصب واگ را در دیواره روده تحریک نموده و این تحریک عصبی باعث انتقال سیگنالی به مرکز عصبی استفراغ در مغز و نیز افزایش حرکات روده‌ای می‌گردد (Vianello, 2006; Vasconcelos & de Souza da Cunha, 2010). با شروع فعالیت گیرنده‌های روی نوروپاتی برنده عصب واگ، فعالیت تهوع‌آوری آغاز می‌گردد (Hu *et al.*, 2008). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوی همچنین می‌توانند به‌عنوان سوپراکتیوژن عمل نموده، موجب تحریک لنفوسیت‌های T و آزادسازی سیتوکین‌ها و تکثیر سلول‌های T شوند (Balaban & Rasooly, 2000). SEA شایع‌ترین انتروتوکسین جدا شده از موارد مسمومیت غذایی و مهمترین علت بروز مسمومیت‌های غذایی حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس است. SEA در میانه فاز لگاریتمی تولید می‌شود و به نظر می‌رسد ژن آن توسط یک باکتریوفاژ انتقال می‌یابد (Betley & Anonymus, 1988; Borst & Betley, 1994; Mekalanos, 1988). برخلاف ژن‌های *sec*، *seb* و *sed* ژن *sea* توسط ژن تنظیم‌کننده فرعی (*agr*) تنظیم نمی‌شود (Tremaine *et al.*, 1993). SEC دارای پنج واریانت می‌باشد: SEC₁، SEC₂، SEC₃، SEC₄، SEC₅، SEC₆ و SEC₇ (Bohach & Huang *et al.*, 1987; Schlievert, 1989). با وجود اینکه هر یک از انتروتوکسین‌های نوع C از لحاظ آنتی‌ژنیسیته از هم متفاوت هستند اما آنتی‌بادی‌های مربوط به هر یک با یکدیگر واکنش متقابل دارند. ۸۴٪ توالی نوکلئوتیدی SEE مشابه SEA است. ژن SEE با یک فاژ معیوب که وارد کروموزوم شده همراه است (Couch *et al.*, 1988).

از آنجا که سلامت غذا مسئله‌ای بنیادی از دیدگاه مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان مواد غذایی می‌باشد و با توجه به گزارش موارد متعدد در رابطه با عفونت‌ها و مسمومیت‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده و اهمیت توکسین‌های استافیلوکوکوی در بهداشت عمومی، توجه به سلامت غذا و ارائه راهکارهایی برای حفظ هر چه بیشتر سلامت مواد غذایی در جامعه رو به گسترش است. تاکنون مطالعات اندکی در مورد ارزیابی تأثیرات

زمان بدست آمد. دوز تلقیح باکتری 1×10^5 CFU/ml بود. محیط حاوی استافیلوکوکوس اورئوس بدون اسانس نیز به عنوان کنترل گرمخانه گذاری شد. رشد باکتری برای ۶ ساعت تحت بررسی قرار گرفت. ۱ میلی لیتر از هر کشت مایع در شرایط استریل برای قرائت جذب در 600 nm به دستگاه اسپکتروفتومتر (انگلستان، Aquarius, Cecil Instruments) منتقل شد. قرائت جذب هر ۳۰ دقیقه تعیین و داده های بدست آمده برای بدست آوردن منحنی رشد در یک نمودار ثبت شد.

بررسی تولید انتروتوکسین

تولید انتروتوکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت غلظت های MIC و تحت MIC اسانس در 35°C درجه سانتی گراد ۱۸ ساعت پس از کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی تولید انتروتوکسین، از کیت کیفی RIDASCREEN SET که یک آزمون ساندویچ آنزیمی ایمنوآسی برای انتروتوکسین های A، B، C، D و E استافیلوکوکوس اورئوس می باشد، استفاده شد. قدرت تشخیص این کیت $0.7-0.2$ نانوگرم انتروتوکسین در هر میلی لیتر سوسپانسیون نمونه است. اساس عمل این کیت بر مبنای واکنش آنتی ژن-آنتی بادی است. وجود انتروتوکسین در نمونه هایی که جذب نوری آنها در طول موج 450 nm نانومتر پایین تر از میزان Cut-off value باشد، منفی و در صورتی که برابر یا بالاتر از Cut-off value باشد، مثبت در نظر گرفته می شود. مراحل این آزمون مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط سازنده کیت انجام شد.

استخراج و خالص سازی RNA

در این مطالعه از محلول (آلمان، Roche) Tripure Isolating Reagent برای استخراج RNA استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی بعد از ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری در 12000 g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C درجه سانتی گراد در سانتریفوژ یخچال دار (Hettich, Mikro 220R) برای بدست آوردن پلت باکتری سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته

(انگلستان) بوده و ویژگی های آن عبارت بود از: ستون موئینه DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۲۵/۰ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا 265°C درجه سانتی گراد و همراه با افزایش تدریجی $2/5^\circ\text{C}$ درجه سانتی گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در 265°C درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه. دمای اتاق تزریق 250°C درجه سانتی گراد و سرعت جریان گاز هلیوم $1/5\text{ ml/min}$ بود. همچنین، طیف سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی (EI) با انرژی یونیزاسیون 70 eV الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون 250°C درجه سانتی گراد انجام شد.

سویه باکتریایی

باکتری مورد بررسی، استافیلوکوکوس اورئوس تحت گونه اورئوس ATCC 29213 بود که از انیستیتو تحقیقات پاستور ایران (تهران) تهیه شد و واجد توانایی ترشح انتروتوکسین های A، C و E بود.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)

MIC به کمترین مقدار از یک ترکیب گفته می شود که می تواند به طور قابل توجهی رشد یک ارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص (۱۶ تا ۲۰ ساعت با توجه به گونه باکتری) مهار کند. در این مطالعه از روش میکروول داپلوشن و براساس دستورالعمل NCCLS (۲۰۰۰) برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد اسانس رزماری بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. برای هر غلظت (مقادیر مختلف اسانس در محیط Tryptose Soy Broth (TSB) حاوی ۵٪ دی متیل سولفوکساید برای پخش شدن یکنواخت اسانس در محیط) سه تکرار در نظر گرفته شد (Saei-Dehkordi et al., 2010).

منحنی رشد

منحنی رشد استافیلوکوکوس اورئوس در 35°C درجه سانتی گراد تحت تأثیر غلظت های MIC، برای بررسی تغییر در تعداد سلول های زنده و میزان جذب طی گذشت

سانتی‌گراد و ۲۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بعد برای غیرفعال شدن واکنش ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌های cDNA بدست آمده برای بررسی صحت عمل روی ژل آگارز برده شد و باندهای تشکیل شده ارزیابی شد.

انجام Real Time PCR

واکنش PCR در حجم ۲۰ μl انجام شد. Real Time PCR برای جستجوی ژن‌های SEA, SEC و SEE با استفاده از محلول Power SYBR Green (Applied Biosystems, USA) انجام شد. مستر میکس تهیه شده شامل پرایمرهای forward و reverse (۱ μl) (جدول ۱) (Qiu *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2009) الگوی cDNA (غلظت نهایی ۱۰ ng/μl)، ۱۰ μl مستر میکس Power SYBR Green و آب فاقد نوکلئاز بود. واکنش در یک ترموسایکلر ABI PRISM 7,500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) انجام شد. شرایط چرخه حرارتی واکنش به صورت زیر بود: یک دوره در ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه در ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰°C به مدت ۱ دقیقه. آنالیز کلیه نمونه‌ها در سه تکرار انجام شد. بیان ژن‌های انتروتوکسین‌ها در برابر بیان ژن 16S rRNA به عنوان استاندارد داخلی نرمال‌سازی شد. سطح بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش Ct، از طریق مقایسه بیان هر ژن در باکتری در معرض اسانس و با بیان همان ژن در باکتری کنترل (رشد یافته در محیط فاقد اسانس) تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های تجربی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شد. اختلاف میان داده‌ها با استفاده از آزمون independent Student t-test تعیین و $p < 0.05$ از لحاظ آماری قابل ملاحظه تلقی شد.

شد. سپس محلول Tripure (یک میلی‌لیتر به ازای هر 1×10^7 سلول در سوسپانسیون سلولی) افزوده و در ۱۵ تا ۲۵+ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) به مدت ۵-۱ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد تا مجموعه‌های نوکلئوپروتئینی تجزیه شوند. به ازای هر یک میلی‌لیتر محلول Tripure، ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم (آلمان، Merck) افزوده و به مدت ۱۵ ثانیه بشدت تکان داده شد. میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵+ تا ۲۵+ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) گرمخانه‌گذاری شد. برای جداسازی محلول به سه فاز، لوله‌ها با دور حداکثر ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در ۸-۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. از فاز رویی RNA با استفاده از سمپلر جداسازی و به یک میکروتیوب قابل سانتریفوژ منتقل شد. پلت RNA برای تجزیه DNA احتمالی موجود در میکروتیوب با Dnase I (Qiagen) تیمار شد (مطابق دستور سازنده کیت). سوسپانسیون بدست آمده تا حجم ۳۰ میکرولیتر با آب فاقد Dnase/Rnase تیمار شده با DEPC (دی‌اتیل پیروکربنات) رقیق شد.

سنتر cDNA

در مرحله اول که به مرحله اتصال (annealing) موسوم است، مواد زیر مطابق پروتکل کیت به میکروتیوب فاقد نوکلئاز منتقل شد؛ یک میکرولیتر پرایمر نوامر، الگوی RNA که میزان آن بستگی به غلظت سوسپانسیون RNA برای هر نمونه داشت، یک میکرولیتر Rnase inhibitor و آب Dnase/Rnase free که به وسیله آن حجم نهایی را به ۱۰ میکرولیتر رسانده و در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از گذشت این مدت زمان میکروتیوب‌ها به سرعت به ظرف حاوی یخ منتقل و خنک شدند.

در مرحله دوم، تحت عنوان extension، به مخلوط بالا ۲ میکرولیتر بافر 10x RT، یک میکرولیتر مخلوط dNTP، ۲ میکرولیتر DTT (دی‌تیوتریتول)، یک میکرولیتر آنزیم RT اضافه و حجم نهایی هر میکروتیوب با استفاده از آب Dnase/Rnase free به ۲۰ میکرولیتر رسانده و ورتکس (short spin) شد. میکروتیوب‌ها ۵ دقیقه در ۲۵ درجه

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای ارزیابی بیان ژنهای انتروتوکسین‌های A، C و E

منبع	طول (bp)	توالی (5'→3')	نام پرایمر
Qiu <i>et al.</i> , 2010	120	ATGGTGCTTATTATGGTTATC	SEA-F
		CGTTTCCAAAGGTACTGTATT	SEA-R
Fischer <i>et al.</i> , 2009	257	TTTTTGGCACATGATTTAATTT	SEC-F
		CAACCGTTTTATTGTCGTTG	SEC-R
Su & Wong, 1997	178	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAG	SEE-F
		TAACCTACCGTGGACCCTTC	SEE-R
Qiu <i>et al.</i> , 2010	287	GCTGCCCTTTGTATTGTC	16s rRNA-F
		AGATGTTGGGTAAAGTCCC	16s rRNA-R
Qiu <i>et al.</i> , 2010	274	TGATAATCCTTATGAGGTGCTT	agrA-F
		CACTGTGACTCGTAACGAAAA	agrA-R

نتایج

نمونه‌ها به ترتیب ۳۵/۶، ۶۱/۸، ۶۶/۹ و ۶۶/۴ کنترل بودند.

نتایج آزمون ELISA برای بررسی اثر ممانعت‌کنندگی غلظت‌های مختلف اسانس رزماری بر تولید انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس در ۳۵ درجه سانتی‌گراد در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که تیمار با اسانس رزماری باعث کاهش تولید انتروتوکسین‌های A، C و E توسط استافیلوکوکوس اورئوس شده و روند کاهش وابسته به دوز است. در این مطالعه، غلظت $25 \times \text{MIC}$ هیچ تأثیر بازدارنده‌ای بر تولید انتروتوکسین‌های A، C و E نداشت. با افزایش غلظت اسانس به $50 \times \text{MIC}$ و $75 \times \text{MIC}$ تأثیر بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای ($p < 0.05$) بر تولید انتروتوکسین‌های A، C و E در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده شد و غلظت $75 \times \text{MIC}$ اسانس در این دما تولید انتروتوکسین را به طور کامل مهار کرد ($p < 0.05$).

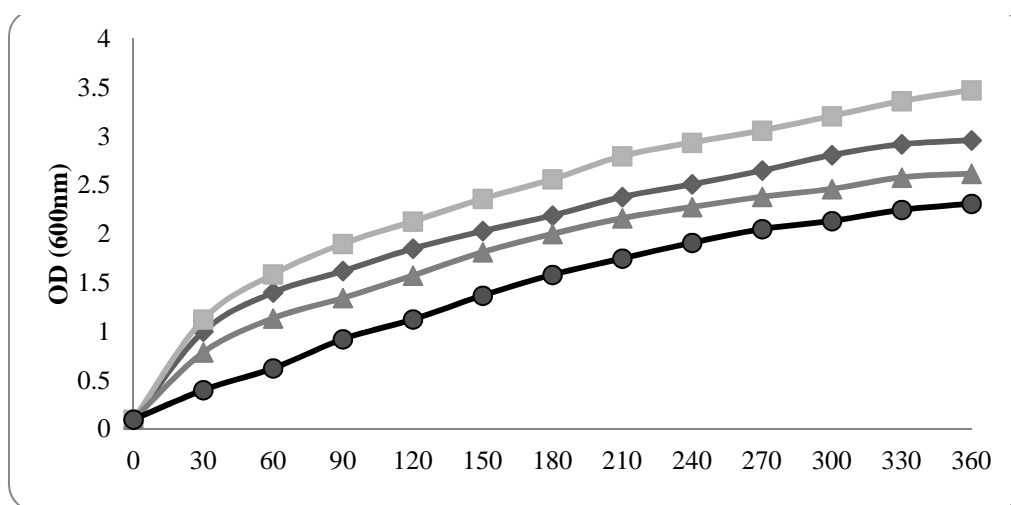
با توجه به اینکه اسانس رزماری در آزمون ELISA به میزان قابل ملاحظه‌ای تولید SEA، SEC و SEE را توسط استافیلوکوکوس اورئوس کاهش داد، در این مطالعه فرض بر این شد که اسانس می‌تواند موجب کاهش نسخه برداری ژن‌های *sea*، *sec* و *see* در استافیلوکوکوس

بازده اسانس بخش‌های هوایی خشک شده گیاه رزماری معادل ۲/۸۳٪ (حجمی/وزنی) بود. ترکیب‌های اسانس از طریق مقایسه شاخص بازدارندگی و طیف جرمی هر ترکیب با داده‌های منتشر شده در متون (Recsei *et al.*, 1986; Adams, 2001) و طیف مرجع در کتابخانه رایانه‌ای (کتابخانه NIST MS، نسخه ۲/۰) تعیین گردید. مطابق نتایج حاضر، ترکیب اصلی اسانس رزماری شامل آلفا-پینن (۴۲/۸٪)، ورنون (۹/۹٪)، کامفن (۷/۵٪)، ۸،۱-سینئول (۵/۸۱٪)، ۳-اکتانول (۴/۸٪)، بتا-میریسین (۳/۶۶٪) و پارا-سیمین (۳/۱۳٪) می‌باشد.

مقدار MIC اسانس رزماری برای استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 معادل ۰/۴٪ بدست آمد. منحنی‌های رشد استافیلوکوکوس اورئوس کشت شده در غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس در ۳۵ درجه سانتی‌گراد در شکل ۱ آورده شده است. اسانس رزماری در سطح ۲۵٪ و $50 \times \text{MIC}$ تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. در کشت باکتری در مجاورت اسانس در غلظت $75 \times \text{MIC}$ ، سرعت رشد به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت و پس از گذشت ۳۰، ۱۸۰، ۲۷۰ و ۳۶۰ دقیقه تیمار با اسانس، OD_{600}

استافیلوکوکوس اورئوس طی تیمار با اسانس مشاهده شد (شکل ۲). به عنوان مثال، در کشت باکتری در مجاورت غلظت $75 \times \text{MIC}$ اسانس، سطح نسخه برداری *sec*، *sea*، *agrA* و *see* به ترتیب $8/2$ ، $7/6$ ، $8/47$ و $8/84$ برابر نسبت به کنترل کاهش یافت ($p < 0.05$).

اورئوس گردد. از این رو RT-PCR کمی برای ارزیابی سطح بیان نسبی ژن های *sea*، *sec* و *see* انجام شد. از آنجا که بیان این ژن ها توسط سیستم دو جزئی *agrA* کنترل می شود (Oussalah et al., 2007)، نسخه برداری *agrA* نیز مورد بررسی قرار گرفت. روند کاهشی وابسته به دوز در سطح نسخه برداری *sec*، *sea*، *agrA* و *see* در



شکل ۱- منحنی رشد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 در ۳۵ درجه سانتی گراد

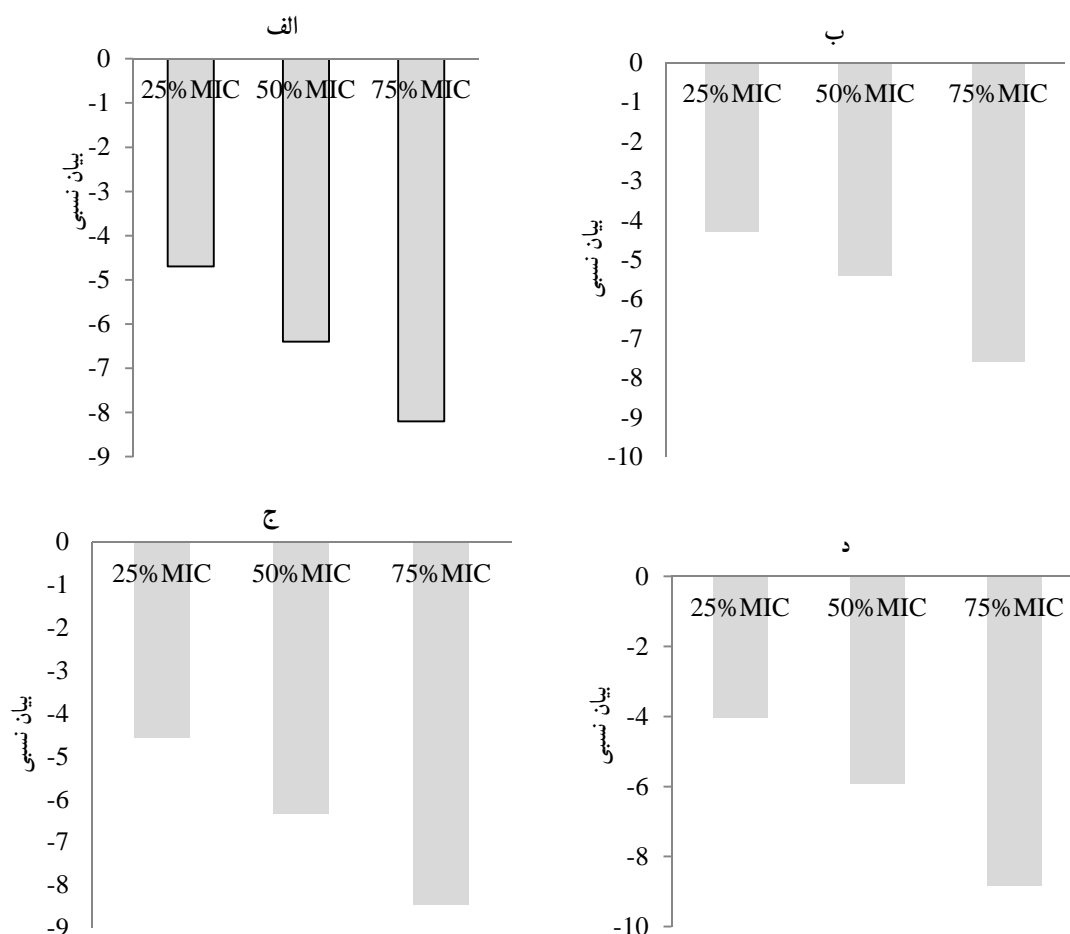
(○): کنترل، (△): $25 \times \text{MIC}$ ، (◇): $50 \times \text{MIC}$ ، (□): $75 \times \text{MIC}$ ، (▽): اعداد گزارش شده حاصل میانگین سه تکرار می باشد ($p < 0.05$). حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) اسانس رزماری در این مطالعه برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 معادل 0.4% بدست آمده است.

جدول ۲- نتایج تولید انتروتوکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213

در مجاورت غلظت های مختلف اسانس رزماری

غلظت اسانس	انتروتوکسین A	انتروتوکسین C	انتروتوکسین E
کنترل (فاقد اسانس)	+++	++++	+++
$25 \times \text{MIC}$	+	+	+
$50 \times \text{MIC}$	±	±	±
$75 \times \text{MIC}$	-	-	-
MIC	-	-	-

*: حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) اسانس رزماری در این مطالعه برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 معادل 0.4% بدست آمد.



شکل ۲- بیان نسبی *sea* (الف)، *sec* (ب)، *see* (ج) و *agrA* (د)

در استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس رزماری

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس بکار رود. نتایج مشابهی نیز توسط Smith-Palmer و همکاران (۲۰۰۴) بدست آمد که فعالیت قابل ملاحظه غلظت‌های بازدارنده اسانس‌های میخک، دارچین و خور را در کاهش تولید انتروتوکسین A و آلفا-توکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌داد. در مطالعه Qiu و همکاران (۲۰۱۰) که به بررسی تأثیر غلظت‌های تحت بازدارنده تیمول (MIC: 64 μg/ml) بر بیان ژنی دو انتروتوکسین SEA و SEB و آلفا-همولیزین در استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند، نتایج نشان داد که غلظت‌های تحت بازدارنده تیمول تولید آلفا-همولیزین، SEA و SEB را در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس کاهش می‌دهد. به‌عنوان مثال، کشت باکتری تحت ۵۰% MIC

از مهمترین ترکیب‌های اسانس رزماری ۸،۱-سینئول است. Asanova و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که این ترکیب فعالیت سیتوتوکسیسیته بسیار بالایی دارد و ممکن است این ترکیب نقش اصلی را در سیتوتوکسیسیته این اسانس بر عهده داشته باشد. همچنین، ۸،۱-سینئول تأثیر توکسیک بسیار قوی بر سلول‌های یوکاریوتی نشان داده است (Asanova et al., 2003; Obeng-Ofori & Reichmuth, 1997).

در این مطالعه، فعالیت اسانس رزماری در برابر استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده شد؛ از این رو، اسانس رزماری می‌تواند به‌عنوان یک منبع اولیه برای تهیه ترکیب‌های ضد میکروبی طبیعی برای بازدارنده از رشد

در مقابل، آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوسایدال که بر دیواره سلولی تأثیر می‌گذارند، تولید آلفا-همولیزین، انتروتوکسین‌ها و TSST-1 را از طریق تأثیر بر سنتز آگزوپروتئین‌ها کاهش داده یا متوقف می‌کنند (Bernardo et al., 2004). همچنین، ثابت شده‌است که برخی ترکیب‌های گیاهی (مانند اولئوروپئین، اپی‌کاتچین گالات) و اسانس‌ها (مانند اسانس خور، میخک و دارچین) در غلظت‌های تحت بازدارنده سنتز آگزوتوکسین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Shah et al., 2008; Stevens et al., 2007; Tranter et al., 1993).

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی تولید شده در مواد غذایی که موجب بروز مسمومیت غذایی می‌شوند، از انواع انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت بوده و بیان ژنی آنها توسط شبکه‌ای از ژن‌های تنظیم‌کننده مانند *agr*، *sar* و *sae* تنظیم می‌شود (Goerke et al., 2001). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که غلظت‌های تحت بازدارنده عوامل ضد میکروبی در ترجمه یک یا تعداد بیشتری از محصولات ژن‌های تنظیم‌کننده در استافیلوکوکوس اورئوس اختلال ایجاد کرده، بنابراین نسخه‌برداری ژن‌های کدکننده آگزوپروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Kuroda et al., 2007). در این مطالعه، از RT-PCR نیمه کمی برای بررسی تأثیر اسانس رزماری بر بیان ژن *agr* استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. نتایج نشان داد که اسانس به میزان قابل ملاحظه‌ای از رونویسی *agrA* جلوگیری می‌کند. بنابراین، تصور می‌رود که کاهش تولید فاکتورهای ویروالانس مشاهده شده در این مطالعه، تا حدودی به بازداری عملکرد سیستم دو جزئی *agr* توسط ترکیب‌های مؤثر اسانس مربوط است.

در مطالعه حاضر، با استفاده از آنالیزهای نسخه‌برداری و بیان ژنی نشان داده شد که غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس رزماری ترشح SEA، SEC و SEE را در استافیلوکوکوس اورئوس در روند وابسته به دوز کاهش می‌دهند. این نتایج نشان می‌دهد که اسانس رزماری می‌تواند به‌عنوان نگهدارنده در محصولات غذایی برای بازداری رشد استافیلوکوکوس اورئوس بکار رود. بنابراین با توجه به افزایش وقوع مقاومت

سطح نسخه‌برداری و بیان ژنی *agrA*، *sea*، *hla* و *seb* را به ترتیب ۱۰/۲، ۸/۶، ۵/۲ و ۷/۲ برابر نسبت به کنترل (فاقد تیمول) کاهش می‌دهد. نتایج این تحقیق در خصوص بیان ژنی *agrA* و *sea* با نتایج مطالعه Qiu و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد.

نتایج مطالعه Parsaeimehr و همکاران (۲۰۱۰) که تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس *Zataria multiflora* Boiss. در مقادیر ۰٪، ۰/۰۰۵٪، ۰/۰۱۵٪، نیسین (۲۵۰µg/ml) و ۰/۰۱۲۵٪ و ترکیب آنها را برای تولید انتروتوکسین C (SEC) و -همولیزین (توکسین) توسط استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند، نشان داد که غلظت‌های اسانس در مقادیر ۰/۰۱۵٪ و ۰/۰۰۵٪ به میزان قابل ملاحظه‌ای از تولید SEC و همولیز به علت کاهش عمده در تولید -توکسین جلوگیری می‌کند که با نتایج مطالعه حاضر در رابطه با تأثیر اسانس بر کاهش تولید انتروتوکسین مطابقت دارد.

هدف قرار دادن فاکتورهای بیماری‌زای باکتریایی (انتروتوکسین‌ها، همولیزین‌ها و...) در حال حاضر به‌عنوان یک راهبرد جایگزین برای توسعه انواع جدیدی از مواد نگهدارنده ضد میکروبی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران و محققان صنایع غذایی قرار گرفته است (Parsaeimehr et al., 2010; Escaich, 2008). پاتوژنیسیته استافیلوکوکوس اورئوس مشابه بسیاری دیگر از باکتری‌های گرم مثبت است و شدت آن به تولید فاکتورهای ویروالانس خارج سلولی متعدد بستگی دارد. در نهایت، عملکرد ترکیب‌های نگهدارنده نه تنها توسط فعالیت بازدارندگی رشد یا باکتری‌کشی بلکه توسط تأثیر آنها بر آزادسازی فاکتورهای ویروالانس تعیین می‌شود (Cegelski et al., 2008).

بسیاری از ترکیب‌های نگهدارنده، به‌ویژه در غلظت‌های تحت بازدارنده، ترشح آگزوتوکسین در استافیلوکوکوس اورئوس را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بازدارنده‌های سنتز پروتئین، در غلظت‌های تحت بازدارنده به میزان قابل توجهی از تولید فاکتورهای ویروالانس (مانند آلفا-همولیزین، SEA، SEB و پروتئین A) در استافیلوکوکوس اورئوس بازداری می‌کنند (Herbert et al., 2001; Koszczol et al., 2006).

- Debersac, P., Haydel, J.M, Amiot, M.J, Goudonnet, H., Artue, Y., Suschetet, M. and Siess, M.H., 2001. Introduction of cytochrome P450 and/or dhietoxication enzymes by various extracts of rosemary description of specific patterns. *Food and Chemical Technology*, 39(9): 907-918.
- Escaich, S., 2008. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy. *Current Opinion in Cheical Biology*, 12(4): 400-408.
- Fischer, A., Francios, P., Holtfreter, S., Broeker, B.M. and Schrenzel, J., 2009. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods*, 77(2): 184-190.
- Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Shil, X.G., Wang, Z., Sunl, S. and Efferth, T., 2007a. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10): 989-994.
- Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Efferth, T., Lianch, H., Liu, Z. and Liu, W., 2007b. Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy. *Planta Medica*, 73(12): 1275-1280.
- Goerke, C., Fluckiger, U., Steinhuber, A., Zimmerli, W. and Wolz, C., 2001. Impact of the regulatory loci *agr*, *sarA* and *sae* of *Staphylococcus aureus* on the induction of alpha-toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. *Molecular Microbiology*, 40(6): 1439-1447.
- Hennekinne, J.A., Brun, B., De Buyser, M.L., Dupuis, A., Ostyn, A. and Dragacci, S., 2009. Innovative application of mass spectrometry for the characterization of staphylococcal enterotoxins involved in food poisoning outbreaks. *Applied Environmental Microbiology*, 75(3): 882-884.
- Herbert, S., Barry, P. and Novick, R.P., 2001. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infections and Immunology*, 69(5): 2996-3003.
- Hu, D.L., Omoe, K., Inoue, F., Kasai, T., Yasujima, M., Shinagawa, K. and Nakane, K., 2008. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 57(9): 1106-1112.
- Huang, I.Y., Hughes, J.L., Bergdoll, M.S. and Schantz, E.J., 1987. Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. *Journal of Biological Chemistry*, 262(15): 7006-7013.
- Jamshidi, R., Afzali, Z. and Afzali, D., 2009. Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison

آنتی‌بیوتیکی، نیاز به یافتن عوامل ضد میکروبی جدید و متنوع در صنعت غذا و دارو احساس می‌شود.

نتایج حاصل از این پژوهش حکایت از توانایی بالقوه اسانس رزماری در بازداري رشد دارد و کاهش تولید انتروتوکسین و توانمندی اسانس برای استفاده به‌عنوان یک نگهدارنده غذایی طبیعی سبز می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, 469p.
- Anonymous, A., 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *European Food Safety Authority Journal*, 130: 1-310.
- Asanova, Zh.K., Suleimenov, E.M., Atazhanova, G.A., Dembitskii, A.D., Pak, R.N., Dar, A. and Adekenov, S.M., 2003. Biological activity of 1,8-cineole from levant wormwood. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(1): 28-30.
- Balaban, N. and Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61: 1-10.
- Bernardo, K., Pakulat, N., Fleer, S., Schnaith, A., Utermöhlen, O., Krut O., Müller, S. and Krönke, M., 2004. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2): 546-555.
- Betley, M.J. and Mekalanos, J.J., 1988. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology*, 170: 34-41.
- Bohach, G.A. and Schlievert, P.M., 1989. Conservation I biologically active portions of staphylococcal enterotoxins C1 and C2. *Infections and Immunology*, 57(7): 2249-2252.
- Borst, D.W. and Betley, M.J., 1994. Promoter analysis of the staphylococcal enterotoxin A gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3): 1883-1888.
- Cegelski, L., Marshall, G.R., Eldridge, G.R. and Hultgren, S.J., 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 17-27.
- Couch, J.L., Soltis, M.T. and Betley, M.J., 1988. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology*, 170: 2954-2960.

- detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, 77(1-2): 61-70.
- Saei-Dehkordi, S.S., Tajik, H., Moradi, M. and Khalighi-Sigaroodi, F., 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. From different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6): 1562-1567.
 - Shah, S., Stapleton, P.D. and Taylor, P.W., 2008. The polyphenol (2)-epicatechin gallate disrupts the secretion of virulence-related proteins by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2): 181-185.
 - Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18(4): 463-470.
 - Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., 2004. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(10): 1023-1027.
 - Stevens, D.L. Ma, Y., Salmi, D.B., McIndoo, E., Wallace, R.J. and Bryant, A.E., 2007. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillinsensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases*, 195(2): 202-211.
 - Su, Y.C. and Wong, A.C.L., 1997. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. *Journal of Food Protection*, 60: 195-202.
 - Tassou, C., Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J.E., 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33: 273-280.
 - Tranter, H.S., Tassou, C.C. and Nychas, G.J.E., 1993. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3): 253-259.
 - Tremaine, M.T., Brockman, D.K. and Betley, M.J., 1993. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infection and Immunology*, 61: 356-359.
 - Vasconcelos, N.G. and de Souza da Cunha, M.L.R., 2010. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *Journal of Public Health Epidemiology*, 2(3): 29-42.
 - Vianello, M.A., 2006. Caracterização genotípica dos fatores de virulência e seu regulador *agr* em cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis à oxacilina. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 99p.
 - with other countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 5(1): 78-81.
 - Koszczol, C., Bernardo, K., Kronke, M. and Krut, O., 2006. Subinhibitory quinupristin/dalfopristin attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(3): 564-574.
 - Kuroda, H., Kuroda, M., Cui, L. and Hiramatsu, K., 2007. Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiology Letters*, 268: 98-105.
 - Moghtader, M. and Afzali, D., 2009. Study of the antibacterial properties of the essential oil of rosemary. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 5(3): 393-397.
 - NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard, M7-A5.
 - Obeng-Ofori, D. and Reichmuth, C., 1997. Biological activity of eugenol, a major component of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored product coleopteran. *International Journal of Pest Management*, 43: 89-94.
 - Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M., 2007. Inhibitory of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli* O157:H7, *salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5): 414-420.
 - Parsaeimehr, M., Akhondzadeh Basti, A.A., Radmehr, B., Misaghi, A., Abbasifar, A., Karim, G., Rokni, N., Sobhani Motlagh, M., Gandomi, H., Noori, N. and Khanjari, A., 2010. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, nisin, and their combination on the production of enterotoxin C and alpha-hemolysin by *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(3): 456-463.
 - Qiu, J., Wang, D., Xiang, H., Feng, H., Xia, L., Jiang, Y., Xia, L., Dong, J., Lu, J., Lu, Y. and Deng, X., 2010. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *Plos ONE*, 5(3): e9736.
 - Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. and Novick, R.P., 1986. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Molecular and General Genetics*, 202: 58-61.
 - Rosec, J.P. and Gigaud, O., 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types

Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil on growth and enterotoxin A, C and E production of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

M. Azizkhani^{1*}, R. Aznar² and P. Elizaquivel³

1*- Corresponding author, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran, E-mail: azizkhani.maryam@gmail.com

2- Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, and the Department of Biotechnology, Institute of Agro Chemical and Food Technology, Valencia, Spain

3- Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Valencia, Spain

Received: March 2014

Revised: May 2014

Accepted: July 2014

Abstract

Staphylococcal food poisoning is resulted from the consumption of a food in which enterotoxigenic staphylococci have grown and produced toxins. Targeting bacterial virulence factors is now gaining interest as an alternative strategy to develop new types of antimicrobial preservatives. The purpose of this study was to determine the effect of *R. officinalis* L. (Ros) essential oil (EO) on growth and gene expression of enterotoxins A, C, and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. In this study, after determining the minimum inhibitory concentration, the growth and secretion of SEA, SEC, and SEE (detected by ELISA method) by *S. aureus* treated with graded subinhibitory concentrations of EO was evaluated. In addition, the influence of the EO on the transcription of *sea*, *sec* and *see* (the genes encoding SEA, SEC and SEE, respectively) was analyzed by quantitative RT-PCR. Ros EO at a concentration of 75% MIC, significantly, reduced the growth of *S. aureus*. EO inhibited the transcription of *sea*, *sec* and *see* in *S. aureus*, in a dose-dependent manner, resulting in a reduction of SEA, SEC and SEE secretion. These data suggest that the Ros EO may be useful as a natural preservative against the growth and enterotoxin production of *S. aureus* in food industry.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxin, gene expression, *Rosmarinus officinalis* L.