دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۵، صفحه ۸۱۱-۸۰۱ (۱۳۹۴)

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

مریم عزیزخانی[1*]، رزا ازنار[2] و پاتریسیا الیزاکویویل[3]

۱*- 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 اگروشیمی و تکنولوژی مواد غذایی، والنسیا، اسپانیا

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

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۲ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۳

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. علاوه‌بر این، تأثیر اسانس بر نسخه‌برداری ژن‌های *sea*، *sec* و *see* (ژن‌های کدکننده SEA، SEC و SEE) با استفاده از PCR نیمه کمّی 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* بازداری 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 بازداری رشد و تولید انتروتوکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس در صنایع غذایی بکار رود.

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

مقدمه

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، 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 &

Rosec & ؛Balaban & Rasooly, 2000 ؛Wong, 1997
(Hennekinne *et al*., 2009 ؛Gigaud, 2002). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی 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 نورون‌های برنده عصب واگ، فعالیت تهوع‌آوری آغاز می‌گردد (Hu *et al*., 2008). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی همچنین می‌توانند به‌عنوان سوپرآنتی‌ژن 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 & Anonymous, ؛Borst & Betley, 1994 ؛Mekalanos, 1988 2007). برخلاف ژن‌های *seb*، *sec* و *sed*، ژن *sea* توسط ژن تنظیم‌کننده فرعی (*agr*) تنظیم نمی‌شود (Tremaine *et al*., 1993). SEC دارای پنج واریانت می‌باشد: SEC_1، SEC_2، SEC_3 ، SEC گوسفندی و SEC گاوی (Bohach & Huang *et el*., 1987 ؛Schlievert, 1989). با وجود اینکه هر یک از انتروتوکسین‌های نوع C از لحاظ آنتی‌ژنیسیته از هم متفاوت هستند اما آنتی‌بادی‌های مربوط به هریک 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 استافیلوکوکی 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 اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بر بیان ژنی میکروارگانیسم‌ها 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 به‌ترتیب ۸،۱-سینئول، کامفن، بتا-میرسین، کامفور و بورنئول 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

(انگلستان) بوده و ویژگی‌های آن عبارت بود از: ستون موئینه DB_5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز هلیم ۱/۵ml/min بود. همچنین، طیف‌سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد 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 انتروتوکسین‌های A، C و E بود.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)

MIC به کمترین مقدار از یک ترکیب گفته می‌شود که می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی 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 دایلوشن 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٪ دی‌متیل 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 ۳۵ درجه سانتی‌گراد تحت تأثیر غلظت‌های تحت MIC، برای بررسی تغییر در تعداد سلول‌های زنده و میزان جذب طی گذشت زمان بدست آمد. دوز تلقیح باکتری 1×10^5CFU/ml بود. محیط حاوی استافیلوکوکوس اورئوس بدون اسانس نیز به‌عنوان کنترل گرمخانه‌گذاری شد. رشد باکتری برای ۶ ساعت تحت بررسی قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از هر کشت مایع در شرایط استریل برای قرائت جذب در ۶۰۰nm به دستگاه اسپکتروفتومتر (انگلستان، Aquarius, CecilInstruments) منتقل شد. قرائت جذب هر ۳۰ دقیقه تعیین و داده‌های بدست آمده برای بدست آوردن منحنی رشد در یک نمودار ثبت شد.

بررسی تولید انتروتوکسین

تولید انتروتوکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت غلظت‌های MIC و تحت MIC اسانس در ۳۵ درجه سانتی گراد ۱۸ ساعت پس از کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور بررسی تولید انتروتوکسین، از کیت کیفی RIDASCREEN SET، که یک آزمون ساندویچ آنزیمی ایمنواسی برای انتروتوکسین‌های A، B، C، D و E استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد، استفاده شد. قدرت تشخیص این کیت ۰/۷-۰/۲ نانوگرم انتروتوکسین در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون نمونه است. اساس عمل این کیت بر مبنای واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی است. وجود انتروتوکسین در نمونه‌هایی که جذب نوری آنها در طول موج ۴۵۰ نانومتر پایین‌تر از میزان Cut-off value باشد، منفی و در صورتی‌که برابر یا بالاتر از Cut-off value باشد، مثبت در نظر گرفته می‌شود. مراحل این آزمون مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط سازنده کیت انجام شد.

استخراج و خالص‌سازی RNA

در این مطالعه از محلول (آلمان، Roche) Tripure Isolating Reagent برای استخراج RNA استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی بعد از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری با دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفوژ یخچال‌دار (Hettich, Mikro 220R) برای بدست آوردن پلت باکتری سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته

شد. سپس محلول Tripure (یک میلی‌لیتر به ازای هر ۱×۱۰^{۷} 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 ۱۲۰۰۰g 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.

سنتز 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 نونامر، الگوی RNA که میزان آن بستگی به غلظت سوسپانسیون RNA برای هر نمونه داشت، یک میکرولیتر Rnase inhibitor و آب Dnase/Rnase free که به‌وسیله 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 به‌سرعت 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 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 Real Time PCR در حجم ۲۰µl انجام شد. 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 ۱µl (جدول ۱) (Qiu et al., 2010؛ Fischer et al., 2009) الگوی cDNA (غلظت نهایی ۱۰ng/µl)، ۱۰µl مسترمیکس 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 به‌صورت زیر بود: یک دوره در $۹۵^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه در $۹۵^{\circ}C$ به مدت ۱۵ ثانیه و $۶۰^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه. آنالیز کلیه نمونه‌ها در سه تکرار انجام شد. بیان ژن‌های انتروتوکسین‌ها در برابر بیان ژن 16S rRNA به‌عنوان استاندارد داخلی نرمال‌سازی شد. سطح بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش ΔΔCt، 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 به‌صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شد. اختلاف میان داده‌ها با استفاده از آزمون independent Student t-test تعیین و $p<۰/۰۵$ از لحاظ آماری قابل ملاحظه تلقی شد.

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

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

نتایج

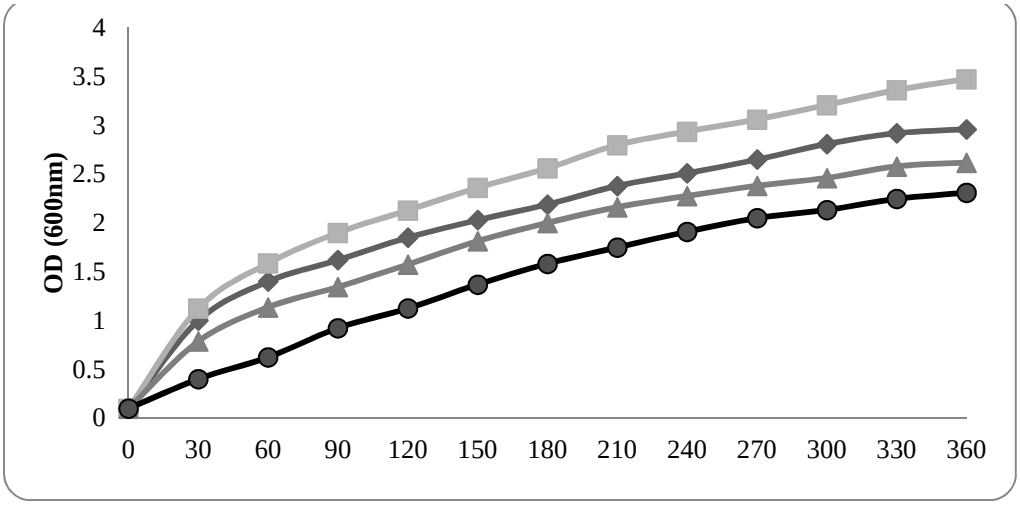
بازده اسانس بخش های هوایی خشک شده گیاه رزماری معادل ۲/۸۳٪ (حجمی/وزنی) بود. ترکیب های اسانس از طریق مقایسه شاخص بازداری و طیف جرمی هر ترکیب با داده‌های منتشر شده در متون (Recsei *et al*., 1986؛ Adams, 2001) و طیف مرجع در کتابخانه رایانه‌ای (کتابخانه NIST MS، نسخه ۲/۰) تعیین گردید. مطابق نتایج حاضر، ترکیب اصلی اسانس رزماری شامل آلفا-پینن (۴۲/۸٪)، وربنون (۹/۹٪)، کامفن (۷/۵٪)، ۸،۱-سینئول (۵/۸۱٪)، ۳-اکتانون (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. منحنی های رشد استافیلوکوکوس اورئوس کشت شده در غلظت‌های تحت بازدارنده اسانس در ۳۵ درجه سانتی گراد در شکل ۱ آورده شده‌است. اسانس رزماری در سطح ۲۵٪ و MIC×۵۰٪ تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. در کشت باکتری در مجاورت اسانس در غلظت MIC×۷۵٪، سرعت رشد به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت و پس از گذشت ۳۰، ۱۸۰، ۲۷۰ و ۳۶۰ دقیقه تیمار با اسانس، OD_{600} نمونه‌ها به‌ترتیب ۳۵/۶، ۶۱/۸، ۶۶/۹ و ۶۶/۴٪ کنترل بود.

نتایج آزمون ELISA برای بررسی اثر ممانعت‌کنندگی غلظت های مختلف اسانس رزماری بر تولید انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس در ۳۵ درجه سانتی گراد در جدول ۲ آورده شده‌است. نتایج نشان می‌دهد که تیمار با اسانس رزماری باعث کاهش تولید انتروتوکسین های A، C و E توسط استافیلوکوکوس اورئوس شده و روند کاهش وابسته به دوز است. در این مطالعه، غلظت MIC×۲۵٪ هیچ تأثیر بازدارنده‌ای بر تولید انتروتوکسین های A، C و E نداشت. با افزایش غلظت اسانس به MIC×۵۰٪ و MIC×۷۵٪ تأثیر بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای ($p<0/05$) بر تولید انتروتوکسین های A، C و E در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده شد و غلظت ۷۵MIC٪ اسانس در این دما تولید انتروتوکسین را به‌طور 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 نسخه‌برداری ژن‌های *sea*، *sec* و *see* در استافیلوکوکوس

اورئوس گردد. از این‌رو RT-PCR کمّی برای ارزیابی سطح بیان نسبی ژن‌های *sea*، *sec* و *see* انجام شد. از آنجا که بیان این ژن‌ها توسط سیستم دو جزئی *agrA* کنترل می‌شود (Oussalah *et al.*, 2007)، نسخه‌برداری *agrA* نیز مورد بررسی قرار گرفت. روند کاهشی وابسته به دوز در سطح نسخه‌برداری *sea*، *sec*، *see* و *agrA* در استافیلوکوکوس اورئوس طی تیمار با اسانس مشاهده شد (شکل ۲). به‌عنوان مثال، در کشت باکتری در مجاورت غلظت MIC×۷۵٪ اسانس، سطح نسخه‌برداری *sea*، *sec*، *see* و *agrA* به‌ترتیب ۸/۲، ۷/۶، ۸/۴۷ و ۸/۸۴ برابر نسبت به کنترل کاهش یافت ($p<0.05$).



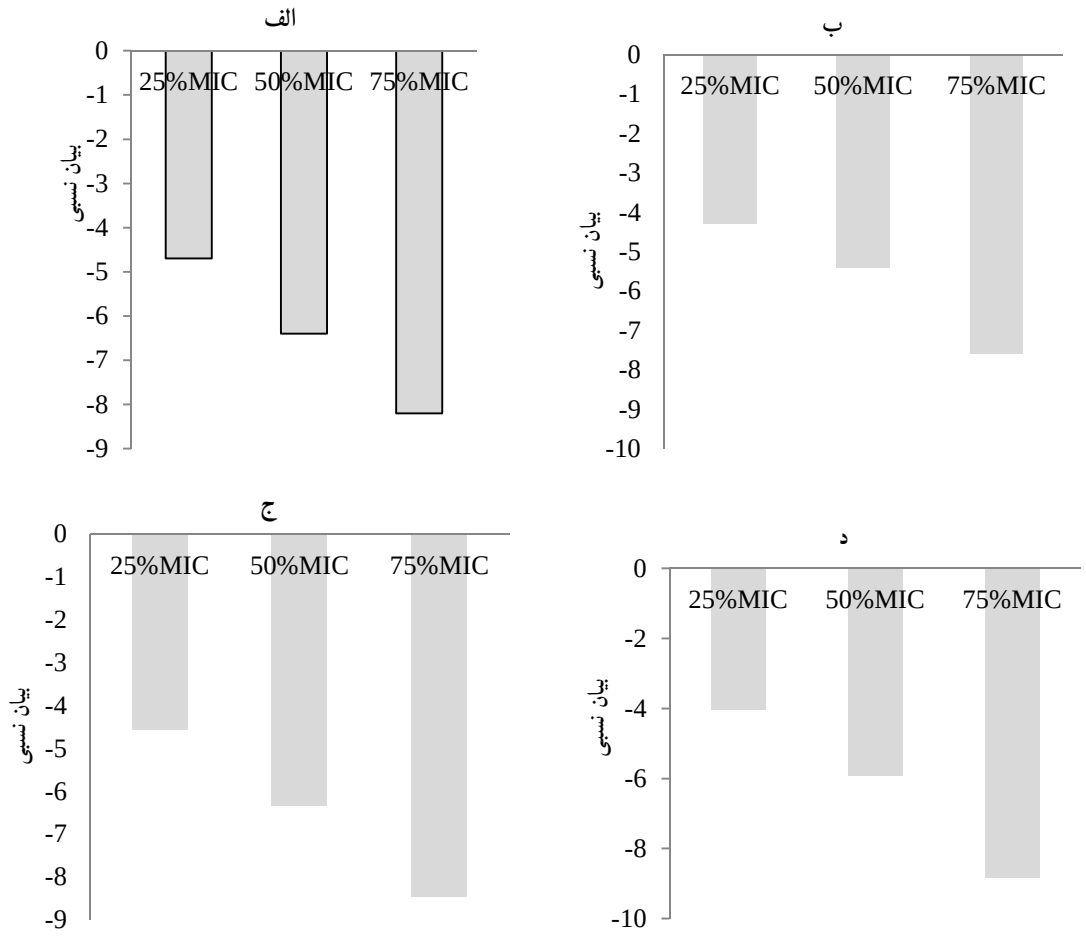
شکل ۱– منحنی رشد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 در ۳۵ درجه سانتی‌گراد

(■): کنترل، (♦): MIC×۲۵٪، (▲): MIC×۵۰٪، (●): MIC×۷۵٪، اعداد گزارش شده حاصل میانگین سه تکرار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) اسانس رزماری در این مطالعه برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 معادل ۰/۴٪ بدست آمده است.

جدول ۲– نتایج تولید انتروتوکسین توسط استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس رزماری

غلظت اسانس	انتروتوکسین A	انتروتوکسین C	انتروتوکسین E
کنترل (فاقد اسانس)	+++	++++	+++
٪۲۵MIC	+	+	+
٪۵۰MIC	±	±	±
٪۷۵MIC	−	−	−
MIC	−	−	−

❋: حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) اسانس رزماری در این مطالعه برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 معادل ۰/۴٪ 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

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

در این مطالعه، فعالیت اسانس رزماری در برابر استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده شد؛ از این‌رو، اسانس رزماری می‌تواند به‌عنوان یک منبع اولیه برای تهیه ترکیب‌های ضدمیکروبی طبیعی برای بازداری از رشد 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: 64µg/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

سطح نسخه‌برداری و بیان ژنی *hla*، *sea*، *seb* و *agrA* را به‌ترتیب ۱۰/۲، ۸/۶، ۵/۲ و ۷/۲ برابر نسبت به کنترل (فاقد تیمول) کاهش می‌دهد. نتایج این تحقیق در خصوص بیان ژنی *sea* و *agrA* 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 (۰/۲۵µg/ml– ۰/۰۱۲۵٪) و ترکیب آنها را برای تولید انتروتوکسین C (SEC) و α–همولیزین (α–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 α–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 ضدمیکروبی 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 ویرولانس 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 ویرولانس تعیین می‌شود (Cegelski *et al.*, 2008).

بسیاری از ترکیب‌های نگهدارنده، به‌ویژه در غلظت‌های تحت بازدارنده، ترشح اگزوتوکسین در استافیلوکوکوس اورئوس را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بازدارنده‌های سنتز پروتئین، در غلظت‌های تحت بازدارنده به میزان قابل‌توجهی از تولید فاکتورهای ویرولانس (مانند آلفا–همولیزین، SEA، SEB و پروتئین A) در استافیلوکوکوس اورئوس بازداری می‌کنند (Koszczol *et al.*, 2006؛ Herbert *et al.*, 2001).

در مقابل، آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوسایدال که بر دیواره سلولی تأثیر می‌گذارند، تولید آلفا–همولیزین، انتروتوکسین‌ها و TSST-1 را از طریق تأثیر بر سنتز اگزوپروتئین‌ها 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 اگزوتوکسین‌ها 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 ضدمیکروبی در ترجمه یک یا تعداد بیشتری از محصولات ژن‌های تنظیم‌کننده در استافیلوکوکوس اورئوس اختلال ایجاد کرده، بنابراین نسخه‌برداری ژن‌های کدکننده اگزوپروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Kuroda *et al.*, 2007). در این مطالعه، از RT-PCR نیمه کمّی 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 ویرولانس 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

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

نتایج حاصل از این پژوهش حکایت از توانایی بالقوه اسانس رزماری در بازداری 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.
- 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. Apllied 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

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., Steward, 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., Mclndoo, 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 a-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 *Staphylocuccus aureus* ATCC 29213

M. Azizkhani[1*], R. Aznar[2] and P. Elizaquivel[3]

1*- Corresponding authur, 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. officianalis* 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.