

معرفی مخلوطی بهینه از عصاره‌های مرزنجوش، فوفل و دارفلفل با بالاترین میزان فعالیت علیه بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B استافیلوکوکوس اورئوس

سید جواد ندافی^۱، علی محمدی ثانی^{۱*}، اسماعیل عطای صالحی^۱، رضا کاراژیان^۲

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان، قوچان، ایران.

۲. پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران.

*نویسنده مسئول: mohamadisani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹

چکیده

با آگاهی یافتن مردم در رابطه با اهمیت عصاره‌های طبیعی با ویژگی‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی، امروزه صنعت غذا به دنبال استفاده از این ترکیبات به جای نگهدارنده‌های سنتزی هستند. تا به امروز پژوهشی جهت یافتن یک مخلوط بهینه‌ای از عصاره‌های مرزنجوش، دارفلفل و فوفل علیه بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B *S. aureus* انجام نشده است، لذا در این پژوهش به دنبال یافتن مخلوطی از این عصاره‌ها با بیشترین فعالیت آنتی‌انتروتوکسین‌زایی به کمک Real-time PCR و روش آماری مخلوط می‌باشیم. در صورت موفقیت، این عصاره‌ها را به عنوان یک عامل آنتاگونیست در برابر رشد باکتری‌های بیماری‌زا و بیان ژن انتروتوکسین *S. aureus* معرفی نماییم. در مرحله اول فعالیت ضد میکروبی سه عصاره مرزنجوش، دارفلفل و فوفل مورد بررسی قرار گرفت که در این میان عصاره مرزنجوش بیشترین فعالیت ضد میکروبی را نشان داد. از سوی دیگر در میان باکتری‌های مورد آزمون باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت باکتری‌های گرم منفی داشتند. عصاره‌های مورد آزمون اثر سینرژیستی بر یکدیگر علیه بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B *S. aureus* داشتند. مخلوطی از عصاره‌ها شامل ۴۷ درصد عصاره مرزنجوش، ۲۷ درصد عصاره دارفلفل و ۲۶ درصد عصاره فوفل بیشترین فعالیت علیه بیان ژن انتروتوکسین‌ها را نشان داد.

کلید واژه‌ها: عصاره‌های طبیعی، ضدباکتریایی، آنتی‌انتروتوکسین‌زایی، Real-time PCR.

مقدمه

امروزه برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود که علاوه بر داشتن برخی ویژگی‌های مضر بر سلامتی انسان، امکان ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد. بنابراین تلاش‌های بسیاری جهت جایگزین کردن داروهایی با منشا گیاهی انجام گرفته است. زیرا ترکیبات ضد میکروبی گیاهی، با ساختارهای متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها، موجب از بین رفتن باکتری‌ها می‌شوند که از نظر بالینی، این موضوع در درمان عفونت‌های ناشی از سویه-

افزودنی‌های طبیعی و سنتزی غذایی به منظور ایمنی، ایجاد ظاهری مطلوب و بهبود عطر و طعم مواد خوراکی استفاده می‌شوند. مصرف‌کنندگان مواد غذایی نسبت به غذاهایی که عاری از مواد شیمیایی بوده و در آن‌ها مواد طبیعی به کار رفته است تمایل بیشتری از خود نشان می‌دهند و به همین دلیل مطالعات زیادی روی امکان جایگزین کردن افزودنی‌های شیمیایی با ترکیبات طبیعی در غذاهای مختلف صورت گرفته است (Nakamura, et al., 1991).

گونه‌های دیگر استافیلوکوکی مانند *Staphylococcus intermedius* ایجاد می‌شود.

توکسین ترشح‌شده توسط این باکتری بوی نامطبوعی ندارند و در ظاهر مواد غذایی نیز تغییری رخ نمی‌دهد. توکسین ترشح شده توسط استافیلوکوک‌ها در برابر حرارت و همچنین آنزیم‌های روده‌ای بسیار مقاوم بوده و درجه پاستوریزاسیون را تحمل می‌نماید، بنابراین پخت غذاها نیز توکسین تولیدشده را از بین نمی‌برد و این سم در برابر جوشاندن به مدت ۳۰ دقیقه مقاومت می‌کند.

تا به امروز پژوهشی جهت یافتن یک مخلوط بهینه‌ای از عصاره‌های مرزنجوش، دارفلفل و فوفل علیه تولید انتروتوکسین‌های A و B *S. aureus* انجام نشده‌است، لذا در این پژوهش به دنبال ارائه‌ی مخلوطی از عصاره‌های مرزنجوش، دارفلفل و فوفل با بیشترین فعالیت آنتی‌انتروتوکسین‌زایی به کمک Real-time PCR و روش آماری مخلوط می‌باشیم و در صورت موفقیت، این عصاره‌ها را به عنوان یک عامل آنتاگونیست در برابر رشد باکتری‌های بیماری‌زا و تولید انتروتوکسین *S. aureus* معرفی نماییم.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و سویه‌های باکتریایی مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، گیاهان دارویی مرزنجوش (*Origanum majorana*)، دارفلفل (*Longpepper*) و فوفل (*Areca*) از بازار محلی قوچان، حلال‌ها و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان تهیه شده است. باکتری‌های مورد آزمون *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC25923)، *سالمونلا انتریتیدیس* (1709PTCC)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 70876) و *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) بودند که گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی تهیه گردید. نوترینت برات، تریپتون سوی برات، تریپتون سوی آگار و مولر هینتون آگار محصول شرکت مرک آلمان استفاده شد.

های مقاوم میکروبی حائز اهمیت است (Oussalah, et al., 2007). استفاده از افزودنی‌های طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی، راه حلی مناسب جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی فرآوری شده می‌باشد که می‌تواند باعث کاهش خطرات بهداشتی و ضررهای اقتصادی ناشی از رشد میکروب‌های با منشاء غذایی شود.

معمولا عصاره‌هایی که قوی‌ترین خاصیت ضدباکتریایی را در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای عامل مسمومیت غذایی دارند شامل درصد زیادی از ترکیبات فنلی از قبیل کارواکرول، اوژنول و تیمول هستند. به نظر می‌رسد که مکانیسم عمل آنها مشابه دیگر ترکیبات فنلی باشد. این ترکیبات معمولا موجب اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، جریان الکترونی و انتقال فعال شده و موجب انعقاد و کوآگوله شدن محتویات سلولی می‌شود (Bert, 2004). اجزا عصاره‌ها همچنین روی پروتئین‌های موجود در غشا سیتوپلاسمی اثر می‌گذارند. آنزیم‌ها از قبیل ATPase در غشای سیتوپلاسمی جای گرفته‌اند و بوسیله مولکول‌های چربی در مرز غشاء وارد شده‌اند. دو مکانیسم احتمالی پیشنهاد شده‌است که به وسیله آن هیدروکربن‌های حلقوی می‌توانند عمل کنند. مولکول‌های هیدروکربن چربی‌دوست می‌توانند در یک لایه بدون چربی تجمع پیدا کنند و واکنش چربی-پروتئین را از شکل طبیعی خارج کنند سپس واکنش مستقیم ترکیبات چربی‌دوست با قسمت‌های آبگریز پروتئین‌ها ممکن گردد (Bert, 2004).

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی^۱ یکی از رایج‌ترین بیماری‌های با منشا غذایی در سراسر جهان متعاقب مصرف انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی تولید شده توسط سویه‌های انتروتوکسیژنیک کوآگولاز مثبت *S. aureus* و بعضا توسط

¹Staphylococcal food poisoning

استخراج عصاره‌ها

گیاهان دارویی مورد مطالعه، پس از تمیز نمودن، در حلال اتانول خیسانده شدند. عصاره‌های استحصال شده پس از فرایند فیلتراسیون، توسط اواپراتور چرخنده (هیدلف، آلمان) تغلیط و در نهایت به کمک آون خلا خشک (شل لب 1410D-2E، آمریکا) و به حالت پودر در آورده شدند. جهت جلوگیری از آسیب حرارتی به ترکیبات فعال عصاره‌ها، طی خشک کردن از دمای نسبتاً پائین (۴۰ درجه سلسیوس) استفاده شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی

از روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار جهت بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های استخراج شده استفاده شد. بدین ترتیب که از باکتری‌های فعال شده (۲۴ ساعت رشد کرده) سوسپانسیونی معادل با کدورت لوله نیم مک‌فارلند استاندارد تهیه شد. سپس توسط سوآپ استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل سطحی کشت شد. دیسک‌های استریل با قطر ۶ میلی‌متر در محلول عصاره تهیه شده با غلظت‌های مشخص (۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵ و ۵ میلی-گرم بر لیتر) خیسانده شدند و از آنها در سطح پتری‌دیش‌ها استفاده شدند. سپس پتری‌دیش‌های تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد (اسکالتسا و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین شاهد منفی که پلیت فاقد باکتری و نیز شاهد مثبت که پلیت بدون عصاره نیز در نظر گرفته شد. دیسک آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و جنتامایسین نیز به منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد آنها با قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آغشته به عصاره استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد

منظور از حداقل غلظت بازدارنده از رشد کمترین غلظتی است که رشد قابل مشاهده یک میکروارگانیسم را بعد از یک شبانه‌روز انکوباسیون، مهار می‌کند. در نتیجه آن کاهش یا بقا یکسان در میزان زنده ماندن تلقیح داریم. برای این منظور از روش رقت آگار استفاده شد؛ بدین ترتیب که عصاره استخراج شده را با محیط کشت مولر هینتون آگار مخلوط نموده و باکتری‌ها به صورت پورپلیت کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت اینکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس، رشد باکتری‌ها بررسی شد به نحوی که اولین پتری‌دیشی که باکتری در آن نتوانست رشد کند به عنوان کمترین غلظت بازدارنده از رشد در نظر گرفته شد. غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده استفاده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورتی برابر استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند استفاده شد. یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت و فاقد باکتری به عنوان شاهد منفی که بیانگر عدم وجود آلودگی است و یک پتری-دیش حاوی محیط کشت و باکتری موردنظر به عنوان مثبت که بیانگر قدرت رشد باکتری می‌باشد نیز استفاده شد.

تعیین کمترین غلظت کشنده باکتری

برای تعیین کمترین غلظت کشنده نیز از روش رقت آگار استفاده شد، با این تفاوت که از پتری‌دیشی که به عنوان MIC در نظر گرفته شده، در محیط نوترینت برات کشت فرعی انجام شد و در صورت عدم مشاهده رشد در محیط مغذی، غلظت MBC با غلظت MIC برابر در نظر گرفته شد و اما در صورت مشاهده رشد باکتری در محیط کشت مغذی، از باکتری‌های رشد کرده در این محیط به محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی عصاره‌های استخراج شده با غلظت‌های بیشتر، کشت فرعی داده شد و غلظتی از این عصاره که در آن رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد. غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی-

گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های استخراج‌شده برای تعیین MBC استفاده شد.

بررسی اثر غلظت‌های کمتر از MIC عصاره‌ها بر بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B استخراج RNA کل از کشت تازه ۲۴ ساعته *S. aureus*، سوسپانسیونی معادل $1/5 \times 10^6$ cfu/ml باکتری تهیه شد و ۱ میلی‌لیتر از آن به محیط مولر هینتون آگار حاوی غلظت‌های مختلف رنگ (۱، ۰.۲، ۰.۴، ۰.۸ و ۱.۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کشت داده و در شرایط یکسان و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از گرم‌خانه‌گذاری، استخراج RNA مطابق پروتوکول شرکت ژن آل انجام شد.

ساخت cDNA

در فرآیندهای مهندسی ژنتیک، DNA مکمل^۱ (cDNA) به رشته‌ای از مولکول DNA اطلاق می‌شود که تحت فعالیت کاتالیتیک آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) از روی رشته mRNA بالغ ساخته می‌شود. آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) ضمن حرکت در امتداد رشته mRNA بالغ، دئوکسی‌ریبونوکلئوتید مکمل هر یک از ریبونوکلئوتیدهای mRNA را از طریق برقراری پیوند هیدروژنی مقابل هم قرار می‌دهد و ضمن تشکیل یک رشته هیبرید نهایتاً منجر به سنتز cDNA می‌گردد. cDNA به‌طور عمده در فرآیند کلونینگ ژنی و همچنین در کاوشگرهای ژنی استفاده می‌گردد (گلیک و پاتن، ۲۰۰۹).

در این مطالعه جهت ساخت cDNA از کیت شرکت ژن آل (کره جنوبی) و مطابق دستورالعمل آن انجام گردید (حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر).

انجام PCR جهت اطمینان از حذف DNA ژنومی از نمونه‌های RNA

چند نمونه RNA استخراج شده و یک نمونه cDNA ساخته شده (جهت اطمینان از پروسه PCR) و کنترل منفی را با پرایمر ژن DNAGyrB، PCR شد. پس از انجام ژل الکتروفورز، نمونه‌ها فاقد باند تکثیر بودند و بدین معنا که DNA ژنومی به‌عنوان آلودگی وجود نداشت. با این حال در نمونه cDNA مورد استفاده باند DNA مشاهده شد.

جهت انجام PCR از کیت GenetBio استفاده شد. روش کار به این صورت بود که به یک میکروتیوب ۱/۵ml freeRNase به ازاء هر نمونه به ترتیب مقادیر جدول ۱ اضافه شد. به عنوان کنترل منفی از ۵μl آب مقطر بدون نوکلئاز استفاده نموده سپس تکثیر مطابق برنامه جدول ۲ انجام شد. در انتها نمونه‌ها را بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد برده و توسط ژل داگ مشاهده شد.

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود چاهک اول حاوی Ladder است. در ۴ چاهک بعدی، نمونه‌های RNA استخراج شده می‌باشد که هیچ باندهای مشاهده نشد. چاهک پنجم حاوی نمونه cDNA است، در چاهک آخر کنترل منفی قرار دارد که باز هم هیچ باندهای مشاهده نشد. در نتیجه خلوص نمونه‌های RNA استخراج شده مورد تایید قرار گرفت. فرآیند الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و جهت انحلال بهتر، محلول آگارز به کمک مایکروویو حرارت‌دهی شد. بارگذاری RNA و cDNA سمت بار منفی دستگاه انجام و جریان برق ۲۲۰ ولت با فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۴۰ دقیقه اعمال گردید و ذرات RNA و cDNA به سمت بار مثبت حرکت کردند.

¹ComplementaryDNA

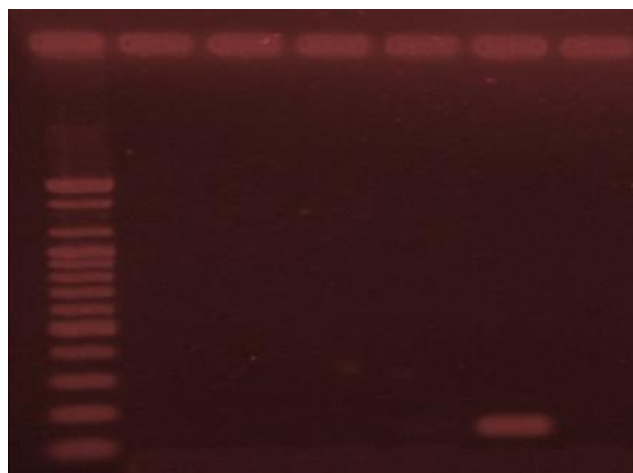
²Reverse transcriptase

جدول ۱- آماده کردن مخلوط واکنش برای انجام PCR نمونه‌های RNA و cDNA

مواد واکنش	حجم
PCR Buffer	2.5 μ l
MgCl ₂	0.75 μ l
Dntp	0.5 μ l
Forward primer	1 μ l
Reverse primer	1 μ l
Taq polymerase	0.3 μ l
Rnase-free water	12.7 μ l
Sample	5 μ l
حجم کلی میکروتیوب	25 μ l

جدول ۲- برنامه ترموسایکلر برای انجام PCR

برنامه	مرحله	دما (°C)	زمان (min)
۱	دنا تورا سیون اولیه	۹۵	۵ دقیقه
	دنا تورا سیون	۹۴	۳۰ دقیقه
۲	چسبیدن	۶۰	۲۰ ثانیه
	تکثیر	۷۳	۲۰ ثانیه
۳	تکثیر نهایی	۷۲	۲ دقیقه



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز، به ترتیب: چاهک اول Ladder، چاهک‌های ۱ تا ۴ حاوی RNA، چاهک پنجم cDNA و چاهک ششم کنترل منفی.

روش انجام Real Time PCR و بررسی میزان بیان ژن‌های *seb* و *sea* جهت بررسی میزان هر کدام از ژن‌های فوق در RNA استخراج شده، از تکنیک Real Time PCR با رنگ SYBRGreen استفاده گردید و این کار با کیت تهیه شده

شدند. روش کار به‌طور مختصر به این صورت بود که ابتدا دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه به منظور دناتوره شدن اولیه (از بین رفتن ساختمان سلولی) اعمال گردید سپس ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ثانیه به منظور دناتوره شدن رشته و در نهایت ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه به منظور مراحل اتصال و تکثیر در نظر گرفته شد. تعداد چرخه نیز ۳۵ دوره در نظر گرفته شد.

از شرکت بایو پارس انجام شد. جدول ۳ پرایمرهای مورد استفاده برای Real Time PCR را نشان می‌دهد. نحوه آماده‌نمودن مخلوط واکنش برای انجام Real Time PCR در جدول ۴ نشان داده شده است. جدول ۵ برنامه دمایی مورد استفاده در ترموسایکلر را نشان می‌دهد. سطوح بیان ژن‌های هدف در نمونه‌های RNA استخراج شده از ایزوله‌های مختلف براساس ژن *gyraseB*، که ژن دخیل در همانندسازی باکتری است، به‌عنوان کنترل داخلی نرمالیزه

جدول ۳- پرایمرهای مورد استفاده در Real Time PCR

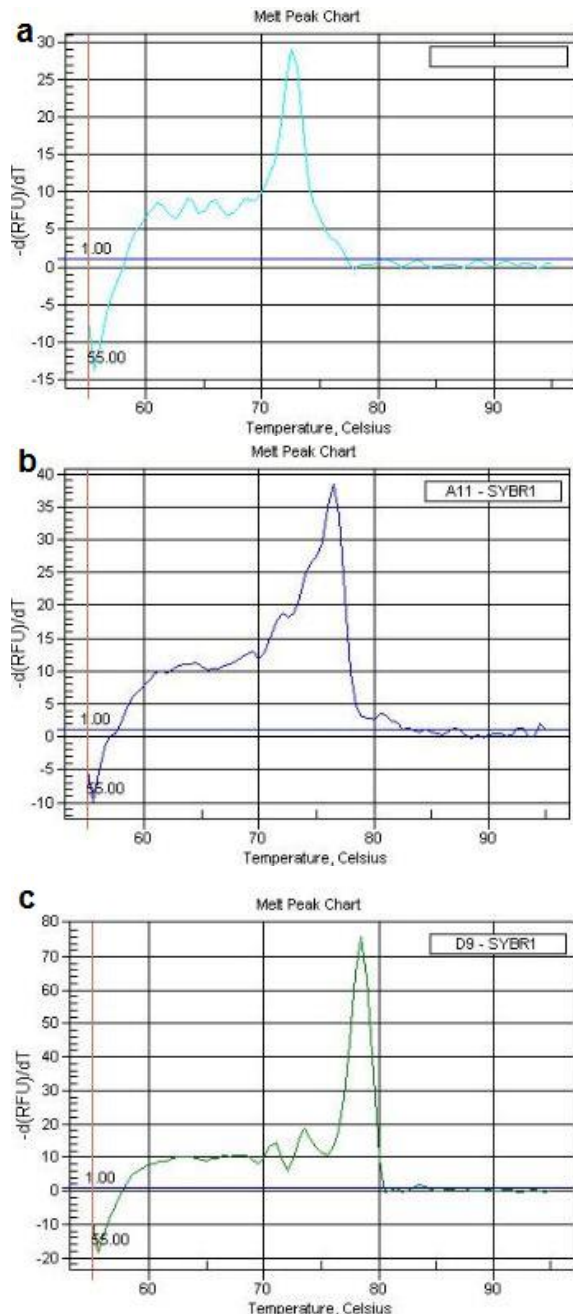
پرایمر	توالی (5' to 3')	اندازه محصول (bp)	منبع
sea-F sea-R	5'-AAAATACAGTACCTTTGGAAACGGTT-3' 5'-TTTCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA-3'	۹۲	کلوترز و همکاران (۲۰۰۳)
Seb-F Seb-R	5'-ACACCCAACGTTTTAGCAGAGAG-3' 5'-CCATCAAACCAGTGAATTTACTCG-3'	۸۱	کلوترز و همکاران (۲۰۰۳)
gyr-F gyr-R	5'-CGCAGGCGATTTTACCATTA-3' 3'-GCTTTCGCTAGATCAAAGTCG	۱۴۱	سیدل و همکاران (۲۰۱۱)

جدول ۴- آماده‌کردن مخلوط واکنش برای انجام Real Time PCR

ترکیب	مقدار	غلظت نهایی
2x QuantiFast SYBR Green Master Mix	12.5 µl	1x
Forward primer	0.5 µl	1 µM
Reverse primer	0.5 µl	1 µM
Template of Cdna	2µl	≤100 ng/ Reaction
Rnase-free water	9.5 µl	-
Total reaction Volume	25 µl	-

جدول ۵- شرایط ترموسایکلر Real Time PCR

پرایمر	دما (°C)	مدت زمان	تعداد سیکل
PCR initial activations	۹۵	min ۵	
Denaturation	۹۵	s ۱۰	۳۵
Combined annealing/extension	۶۰	s ۳۰	



شکل ۲- منحنی دمای ذوب به ترتیب برای ژن‌های (a) sea، (b) seb و (c) gyr B

طرح آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

روش مخلوط مجموعه‌ای از روش‌های آماری و ریاضی است که در بهینه‌سازی فرآیندهای مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. در بهینه‌سازی فرمولاسیون و فرایندهایی که تحت تاثیر چندین فاکتور است، روش آماری مخلوط کارایی بالایی

میزان بیان ژن هدف در نمونه با یک ژن خانه‌دار به عنوان کنترل داخلی نرمالیزه شد در واقع جهت بررسی بیان ژن در شرایط با حضور و بدون حضور رنگ، ابتدا ΔC_T ژن هدف (*sea, seb*) در مقایسه با ژن مرجع (*gyrB*) تعیین شد. به این ترتیب بیان ژن هدف نسبت به ژن مرجع به دست آمد. ΔC_T هر ژن در واقع تفریق C_T ژن هدف از C_T ژن مرجع (خانه‌دار) می‌باشد، یعنی:

$$C_T = C_{T,target} - C_{T,reference} \Delta$$

میزان تغییر بیان یک ژن ($\Delta \Delta C_t$) در شرایط و زمان‌های مختلف با فرمول زیر محاسبه شد:

$$Ct = \Delta C_t(\text{sample}) - \Delta C_t(\text{calibrator}) \Delta \Delta$$

که در این فرمول کالیبراتور در واقع یک نمونه تیمار نشده یا نقطه پایه یا صفر در نظر گرفته شد. در نهایت، میزان تغییر بیان ژن^۲ با فرمول $2^{-\Delta \Delta C_T}$ محاسبه گردید. برای بدست آوردن $\Delta \Delta C_t$ و تجزیه تحلیل داده‌های C_T از نرم افزار 2009REST استفاده گردید.

شکل ۲ منحنی ذوب را برای هر سه ژن مورد ارزیابی را نشان می‌دهد. اصولاً منحنی ذوب واکنش Real Time PCR برای ارزیابی اختصاصی بودن تکثیر استفاده می‌شود (Radonich et al, 2004). همان‌طور که در شکل زیر مشخص است برای هر سه ژن مورد ارزیابی منحنی ذوب دارای یک پیک شارپ می‌باشد که بیانگر اختصاصی بودن واکنش است.

¹Housekeeping

²Fold Change

عصاره‌های دارفلفل و فوفل نشان داد. قطر متوسط هاله عدم رشد برای عصاره‌های مورد آزمون در این پژوهش با هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و جنتامایسین قابل مقایسه بود. همان‌طور که در جدول زیر مشخص است باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی قطر هاله عدم رشد بیشتری را نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان دادند.

دین و اسووبودا (۱۹۹۰) فعالیت ضد میکروبی عصاره مرزنجوش بر تعدادی باکتری و قارچ شاخص مورد بررسی قرار داده و گزارش نمود که *Beneckea natriegens*، *Erwinia carotovora* و *Moraxella* sp. در میان باکتری‌ها و *Aspergillus niger* در میان قارچ‌ها بیشترین حساسیت را به عصاره مرزنجوش داشتند. لی و همکاران (۲۰۰۱) پایپرنونالین و پایپریدین قلیایی را از دارفلفل جدا کرده و نشان دادند که این ترکیبات فعالیت ضدقارچی بارزی دارند. تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره‌های استخراج شده اثر بازدارندگی بر رشد باکتری‌های مورد آزمون دارد، بدین صورت که *B. cereus* و دو باکتری *E. Coli* و *S. enteritidis* به ترتیب کمترین و بیشترین غلظت بازدارنده از رشد را در مقابل عصاره‌های استخراجی داشتند (جدول ۷).

از خود نشان می‌دهد. در روش مخلوط به هر یک از فاکتورها که متغیرهای مستقل را تشکیل می‌دهند جزء نامیده می‌شوند (BurukSahin et al, 2016).

در این پژوهش اجزای مخلوط شامل غلظت عصاره‌های مرزنجوش، فوفل و دارفلفل، هر یک در پنج سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر سطوح هر یک از اجزا در جدول زیر نشان داده شده است. مدل مورد استفاده در روش مخلوط معمولاً معادله‌ی درجه دوم است. در این روش برای هر متغیر وابسته، مدلی تعریف شده که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد (BurukSahin et al, 2016).

نتایج و بحث

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها

روش نفوذ در آگار به کمک دیسک

در این پژوهش ابتدا فعالیت هر یک از عصاره‌ها را به طور جداگانه بررسی شد. جدول ۶ نتایج مربوط به هاله عدم رشد را برای هر یک از عصاره‌ها نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول مربوطه مشخص است در میان باکتری‌های مورد آزمون، *B. cereus* بیشترین حساسیت را به هر سه عصاره مورد مطالعه در این پژوهش نشان می‌دهد. در این پژوهش، عصاره مرزنجوش فعالیت ضد میکروبی بیشتری را نسبت به

جدول ۶- قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی‌متر

دیسک	۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	
پ ۱۳	۱۲/۶±۰/۴ ^a	۱۱/۹±۰/۴ ^a	۱۱/۱±۰/۳ ^b	۹/۱±۰/۷ ^c	۸/۲±۰/۴ ^c	<i>B. cereus</i>
ج ۱۱	۱۱/۳±۰/۲ ^a	۱۰/۳±۰/۳ ^b	۸/۷±۰/۳ ^c	۸/۱±۰/۵ ^c	۶/۶±۰/۴ ^d	<i>E. coli</i>
ج ۱۰	۱۰/۹±۰/۳ ^a	۹/۸±۰/۲ ^b	۸/۵±۰/۳ ^c	۷/۷±۰/۵ ^c	۶/۱±۰/۲ ^d	<i>S. enteritidis</i>
پ ۳۲	۱۲/۲±۰/۳ ^a	۱۱/۳±۰/۳ ^b	۹/۶±۰/۳ ^c	۸/۱±۰/۲ ^d	۷/۴±۰/۳ ^e	<i>S. aureus</i>
پ ۱۳	۱۲/۰±۰/۲ ^a	۱۱/۵±۰/۴ ^a	۱۰/۴±۰/۲ ^b	۸/۳±۰/۷ ^c	۸/۰±۰/۴ ^c	<i>B. cereus</i>
ج ۱۱	۱۰/۸±۰/۲ ^a	۹/۹±۰/۳ ^b	۸/۱±۰/۳ ^c	۷/۵±۰/۵ ^c	۶/۳±۰/۴ ^d	<i>E. coli</i>
ج ۱۰	۱۰/۱±۰/۳ ^a	۹/۴±۰/۲ ^b	۸/۲±۰/۳ ^c	۷/۷±۰/۵ ^c	۶/۱±۰/۲ ^d	<i>S. enteritidis</i>

پ ۳۲	۱۱/۶±۰/۳ ^a	۱۰/۵±۰/۳ ^b	۸/۹±۰/۳ ^c	۷/۲±۰/۲ ^d	۵/۵±۰/۳ ^e	<i>S. aureus</i>	
پ ۱۳	۱۲/۴±۰/۶ ^a	۱۲/۰±۰/۴ ^a	۱۰/۸±۰/۲ ^b	۸/۷±۰/۴ ^c	۷/۸±۰/۲ ^d	<i>B. cereus</i>	
ج ۱۱	۱۱/۰±۰/۲ ^a	۱۰/۳±۰/۲ ^b	۸/۴±۰/۳ ^c	۸/۲±۰/۵ ^c	۶/۳±۰/۴ ^d	<i>E. coli</i>	
ج ۱۰	۱۰/۳±۰/۳ ^a	۹/۵±۰/۲ ^b	۸/۴±۰/۳ ^c	۷/۵±۰/۵ ^d	۵/۷±۰/۳ ^e	<i>S. enteritidis</i>	دارفلفل
پ ۳۲	۱۱/۹±۰/۳ ^a	۱۰/۸±۰/۳ ^b	۹/۲±۰/۳ ^c	۸/۰±۰/۲ ^d	۷/۲±۰/۳ ^e	<i>S. aureus</i>	

* پ: دیسک آنتی‌بیوتیک پنی سیلین، ج: دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین

• حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح آماری ۹۵ درصد می‌باشد.

جدول ۷- حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری توسط عصاره‌ها

شاهد مثبت	شاهد منفی	۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	پاتوژن
+	-	-	-	-	+	+	+	<i>B. cereus</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>E. coli</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>B. cereus</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>E. coli</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>B. cereus</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>E. coli</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>

• +: رشد یافته؛ -: عدم رشد

عصاره استخراج شده از فوفل و دارفلفل بیشتر از عصاره مرزنجوش بودند.

Galindo و همکاران (2003) در مورد عصاره‌ی کاروتنوئیدی (۲/۸ درصد نوربیکسین)، Yalme و همکاران (۲۰۱۴) در مورد رنگ آناتو و Smith-Palmer و همکاران (1998) نیز در مورد عصاره‌های طبیعی به نتیجه مشابه‌ای رسیدند. دلیل احتمالی آن حضور لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. لیپوپلی-ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی، می‌توانند مانع از رسیدن

حداقل غلظت بازدارنده از رشد برای عصاره استخراج شده از مرزنجوش علیه همه‌ی باکتری‌های بیماری‌زا مورد آزمون مشاهده شد. نتایج حاصل از رقت آگار جهت تعیین MIC نشان داد که عصاره‌های استخراج شده بر رشد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی اثر بیشتری داشت. به نحوی که غلظت‌هایی که از رشد *B. cereus* ممانعت می‌کنند، بجز غلظت ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مرزنجوش، از رشد *S. enteritidis* ممانعت نمی‌کند. مطابق جدول ۷ حداقل غلظت بازدارنده از رشد برای

آنتی‌انتروتوکسین‌زایی بیشتری دارد. در میان تیمارها بیشترین کاهش بیان ژن‌های انتروتوکسین‌ها را تیمار ۱۵، که شامل ۶۷ درصد مرزنجوش، ۱۶ درصد فوفل و ۱۷ درصد دارفلفل بود، نشان داد. فعالیت سینرژیستی بین ترکیبات عصاره‌ها عامل اصلی فعالیت آنتی‌انتروتوکسین‌زایی بیشتر در حالت مخلوط نسبت به حالت جداگانه هر یک از عصاره‌ها است. کیو و همکاران (۲۰۱۰) که غلظت‌های تحت‌بازدارنده تیمول را بر تولید آلفا همولایزین، انتروتوکسین‌های A و B توسط *S. aureus* مقاوم به آنتی‌بیوتیک متی‌سلین بررسی و گزارش نمودند که با افزایش غلظت تیمول علاوه بر کاهش رشد باکتری، میزان تولید انتروتوکسین‌های اشاره شده و آلفا همولایزین کاهش یافته است.

پاراسایی مهر و همکاران (۲۰۱۵) اثر آویشن شیرازی را بر بیان ژن انتروتوکسین *S. aureus* بررسی نمودند که در نتایج پژوهش این گروه نیز اثر سینرژیستی آنتی-انتروتوکسین‌زایی بین نایسین و عصاره آویشن شیرازی را بر تولید انتروتوکسین *S. aureus* C مشاهده نمودند. علاوه بر این فعالیت ممانعت‌کنندگی سینرژیستی بین اعمال فشار بالا و باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده باکتریوسین علیه *S. aureus*، توسط آرکیوس و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است. منصور و میلییر (۲۰۰۱) اثر سینرژیستی مونولارین^۱ و نایسین را بر سلول‌های رویشی بر گونه‌های *Bacillus* در شیر را مطالعه و گزارش نمودند که این دو ترکیب اثر ممانعت‌کنندگی سینرژیستی علیه *Bacillus* دارد. ناقمچی و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت ممانعت‌کنندگی پلی‌میکسین B و نایسین A بر *Listeria innocua* و *Escherichia coli* بررسی و نشان دادند که این دو ترکیب فعالیت سینرژیستی دارند و فعالیت ضد میکروبی این دو در حالت مخلوط نسبت به حالت جداگانه هر یک بیشتر می‌باشد.

ترکیبات فعال عصاره یا اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی شود. بین باکتری‌های گرم مثبت، *B. cereus* بیشترین حساسیت را به عصاره‌ها داشت بطوری‌که کمترین میزان MIC و MBC را بین باکتری‌ها داشت. در بین باکتری‌های گرم مثبت، *L. monocytogenes* کمترین حساسیت را مقابل فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های استخراج شده نشان داد بطوری‌که مقادیر MIC علیه *L. monocytogenes* با مقادیر MIC علیه *S. enteritidis* و *E. coli* یکسان مشاهده شد. دلیل احتمالی این پدیده وجود لیپوپلی‌ساکاریدهایی در دیواره‌ی سلولی *L. monocytogenes* است که می‌تواند مقاومت باکتریایی را مثل غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی در مقابل عصاره‌های طبیعی افزایش دهد (BurukSahin و همکاران، 2016).

جدول ۸ نتایج آزمون تعیین حداقل غلظت کشنده باکتری را نشان می‌دهد؛ مطابق جدول کمترین میزان MBC عصاره‌های استخراج شده در مقابل *B. cereus* که معادل غلظت MIC بود، مشاهده شد. غلظت‌های استفاده از عصاره فوفل و دارفلفل علیه باکتری *S. enteritidis* اثر کشنده‌ای نداشت، در حالی که عصاره استخراج شده از مرزنجوش بر همه باکتری‌های مورد آزمون اثر کشنده داشت.

جدول ۹ بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B را در غلظت‌های تحت‌بازدارنده عصاره‌های استخراج شده را نشان می‌دهد. مطابق جدول کمترین میزان بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B برای عصاره مرزنجوش مشاهده شد به طوری که در غلظت ۰/۱ درصد عصاره مرزنجوش هیچ یک از انتروتوکسین‌ها بیان ژن نداشتند. جدول ۱۰ میزان بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B در سطوح مختلف غلظت‌های عصاره‌ها نشان می‌دهد. همانطور که در جدول مشخص است مخلوط عصاره‌ها نسبت به هر یک از آنها به تنهایی فعالیت

¹monolaurin

جدول ۸- حداقل غلظت کشنده از رشد باکتری توسط عصاره‌ها

شاهد مثبت	شاهد منفی	۶۴ میلی- گرم بر میلی لیتر	۳۲ میلی- گرم بر میلی لیتر	۱۶ میلی- گرم بر میلی لیتر	۸ میلی گرم بر میلی لیتر	۴ میلی گرم بر میلی لیتر	۲ میلی- گرم بر میلی لیتر	پاتوژن
+	-	-	-	-	+	+	+	<i>B. cereus</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>E. coli</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>B. cereus</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>E. coli</i>
+	-	+	+	+	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
+	-	-	-	+	+	+	+	<i>B. cereus</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>E. coli</i>
+	-	+	+	+	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>

+: نشان دهنده باکتری‌های رشد یافته در محیط کشت؛ -: نشان دهنده عدم رشد باکتری‌ها در محیط کشت

بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B *S. aureus*

جدول ۹- بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B در غلظت‌های تحت بازدارنده عصاره‌های مرزنجوش، فوفل و دارفلفل

کنترل مثبت	کنترل منفی	۰٫۲ درصد	۰٫۱ درصد	۰٫۰۵ درصد	بیان ژن انتروتوکسین	
+	-	-	-	+	A	مرزنجوش
+	-	-	-	+	B	بیان ژن انتروتوکسین
+	-	-	+	+	A	فوفل
+	-	-	+	+	B	بیان ژن انتروتوکسین
+	-	-	+	+	A	دارفلفل
+	-	-	+	+	B	بیان ژن انتروتوکسین

+: بیان شده؛ -: عدم بیان ژن

جدول ۱۰- نسبت اجزای هر مخلوط و فعالیت آنتی‌انتروتوکسین‌زایی علیه ژن‌های انتروتوکسین‌های A و B

نسبت بیان ژن		اجزا مخلوط			تیمار
SEB	SEA	دارفلفل (C*)	فوفل (B*)	مرزنجوش (A*)	
-16.4	-15.8	0.500	0.000	0.500	1
-14.1	-11	0.500	0.500	0.000	2
-15.5	-11.8	0.000	0.500	0.500	3
-13.5	-10.8	0.500	0.500	0.000	4
-9.8	-8.5	1.000	0.000	0.000	5
-11.5	-11	0.000	0.000	1.000	6
-18.3	-18.5	0.329	0.331	0.339	7
-7.8	-6.5	0.000	1.000	0.000	8
-12	-10	0.000	0.000	1.000	9
-17	-14.8	0.166	0.664	0.170	10

-20.4	-17.5	0.000	0.328	0.672	11
-19.2	-15.4	0.666	0.163	0.171	12
-8.4	-6.1	0.000	1.000	0.000	13
-9	-9.1	1.000	0.000	0.000	14
-22.5	-21.6	0.169	0.161	0.670	15
-16.1	-16.5	0.500	0.000	0.500	16

جهت ارزیابی معنی داری هر یک از عبارت‌های مدل جدول آنالیز واریانس استفاده شد. در این جدول برای هر یک از عبارت‌های مدل مقدار F و یک مقدار P مشخص شده که هر چقدر میزان F بیشتر و میزان p کمتر باشد عبارت مورد نظر تاثیر بیشتری در میزان پاسخ و در واقع میزان معنی داری بیشتری خواهد داشت.

از این رو، برهمکنش عصاره‌های مرزنجوش و دارفلفل و برهمکنش عصاره‌های مرزنجوش و فوفل به ترتیب بیشترین اثر را بر بیان ژن‌های انتروتوکسین‌های A و B داشتند. علاوه بر این هر سه عبارت مخلوط ($A*B$)، $A*C$ و ($B*C$) بر هر دو پاسخ اثر معنی داری در سطح 0.05 داشتند. (جدول ۱۲).

گزینش مدل مناسب و تجزیه مدل برازش یافته پس از مقایسه R^2 های مدل‌های مختلف که در جدول ۱۱ مشخص شده، مدل درجه دوم برای هر دو پاسخ مناسب در نظر گرفته شد. مدل مناسب برای هر یک از پاسخ‌ها به صورت زیر است:

$$\begin{aligned} \text{Gene expression of } sea &= -11.02 (A^*) - 6.02 (B^*) - 8.47 (C^*) - \\ &30.33 (A^*) (B^*) - \\ &31.39 (A^*) (C^*) - \\ &18.06 (B^*) (C^*) \\ \text{Gene expression of } seb &= -12.25 (A^*) - 7.78 (B^*) - 9.52 (C^*) - \\ &35.59 (A^*) (B^*) - \\ &26.77 (A^*) (C^*) - \\ &23.66 (B^*) (C^*) \end{aligned}$$

جدول ۱۱- مقایسه ضریب تعیین مدل‌های مختلف برای هر یک از پاسخ‌ها

پاسخ‌ها		مدل
<i>seb</i>	<i>sea</i>	
		خطی
۸۷/۲۵	۳۸/۵۷	R^2 %
۸۴/۸۰	۲۶/۷۶	R^2 % تصحیح شده
۷۹/۴۳	۱۴/۸۹	R^2 % پیش‌بینی شده
		درجه دوم
۸۹/۶۹	۹۷/۱۸	R^2 %
۸۴/۷۷	۹۵/۸۳	R^2 % تصحیح شده
۷۹/۸۷	۸۸/۹۵	R^2 % پیش‌بینی شده
		مکعبی مخصوص
۹۳/۵۶	۳۹/۱۶	R^2 %
۸۷/۵۳	۰/۰۰	R^2 % تصحیح شده
۱۳/۸۷	۰/۰۰	R^2 % پیش‌بینی شده
		مکعبی
۹۶/۰۰	۹۷/۷۶	R^2 %
۸۸/۷۳	۹۳/۷۰	R^2 % تصحیح شده
۳/۵۳	۴۶/۵۳	R^2 % پیش‌بینی شده

جدول ۱۲- نتایج آنالیز واریانس مدل برای هر یک از پاسخ‌ها

P	F	میانگین مربعات	درجه‌آزادی	منبع	
۰/۰۰۱	۹/۷۵	۵۰/۰۵	۵	رگرسیون	
۰/۰۱۸	۶/۱۸	۳۱/۷۱	۲	خطی مخلوط	
۰/۰۰۳	۱۵/۴۸	۷۹/۴۳	۱	عصاره‌های مرزنجوش و فوفل (AB)	
۰/۰۰۱	۱۸/۶۲	۹۵/۵۵	۱	عصاره‌های مرزنجوش و دارفلفل (AC)	
۰/۰۳۴	۵/۹۸	۳۰/۶۹	۱	عصاره‌های فوفل و دارفلفل (BC)	sea
-	-	۵/۱۳	۱۰	خطای باقیمانده	
۰/۰۶۰	۵/۵۸	۱۰/۰۶	۵	عدم برازش	
-	-	۰/۲۰	۵	خطای خالص	
۰/۰۰۱	۱۰/۸۴	۵۰/۵۹	۵	رگرسیون	
۰/۰۴۰	۴/۵۰	۲۰/۹۸	۲	خطی	
۰/۰۰۱	۲۳/۴۲	۱۰۹/۳۰	۱	AB	
۰/۰۰۳	۱۴/۹۱	۶۹/۵۱	۱	AC	
۰/۰۰۱	۱۱/۲۹	۵۲/۶۸	۱	BC	seb
-	-	۴/۶۷	۱۰	خطای باقیمانده	
۰/۰۵۲	۳/۶۲	۹/۱۶	۵	عدم برازش	
-	-	۰/۱۷	۵	خطای خالص	

نتایج این پژوهش مشابه مشاهدات کیو و همکاران (۲۰۰۷) می‌باشد. این گروه اثر غلظت‌های تحت بازدارنده تیمول را علیه انتروتوکسین‌های A، B و آلفا همولایزین *S. aureus* مقاوم و حساس به متی‌سیلین بررسی نموده و گزارش کردند که رشد و تولید سموم اشاره شده با افزایش غلظت تیمول کاهش می‌یابد.

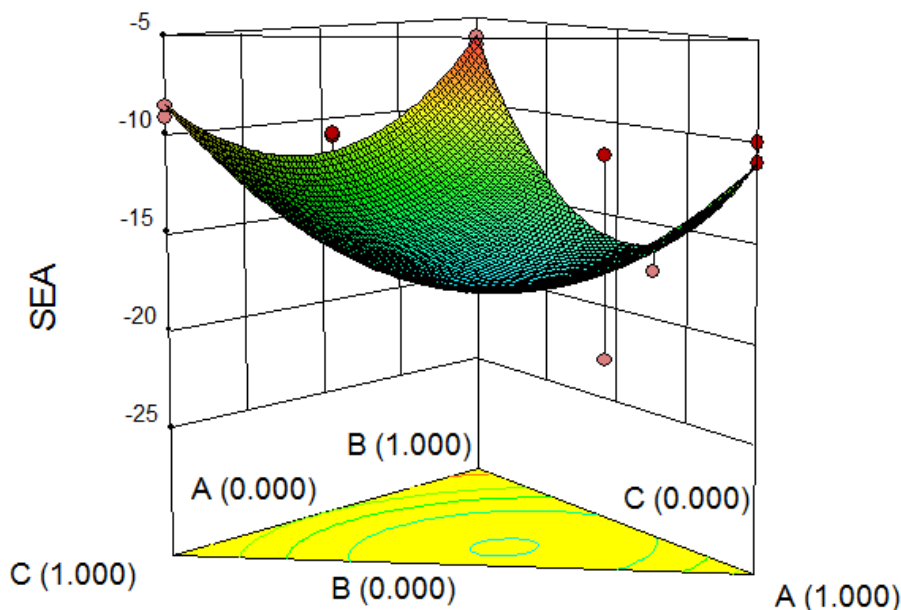
اثر متغیرهای مستقل بر میزان بیان ژن *sea* شکل زیر اثر برهم‌کنش اجزا مخلوط عصاره‌های مرزنجوش، فوفل و دارفلفل بر میزان بیان ژن *sea* را به صورت پلات سطحی نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشخص است عصاره‌های مرزنجوش و دارفلفل به ترتیب کمترین و بیشترین اثر را بر میزان بیان ژن *sea* داشتند (البته در غلظت‌های بالای عصاره‌ها). با افزایش غلظت‌های هر سه عصاره میزان ممانعت از بیان ژن ابتدا افزایش یافته ولی در ادامه در غلظت‌های بالای هر یک از عصاره میزان بیان ژن افزایش می‌یابد (شکل ۳). مطابق شکل کمترین میزان بیان ژن *sea* با تیمار مخلوطی از عصاره‌ها با ۷۰ درصد عصاره مرزنجوش، ۱۰ درصد عصاره فوفل و ۲۰ درصد عصاره دارفلفل حاصل گردید.

اثر متغیرهای مستقل بر میزان بیان ژن جدول ۱۰ مقادیر اندازه‌گیری شده انتروتوکسین‌های A و B تولید توسط *S. aureus* رشد یافته در غلظت‌های تحت بازدارنده عصاره‌ها را نشان می‌دهد. کمترین میزان تولید انتروتوکسین‌های A و B در تیمار با عصاره مرزنجوش مشاهده گردید، به طوری که هر دو انتروتوکسین در غلظت‌های ۰/۲ درصد این عصاره تولید نشده بود.

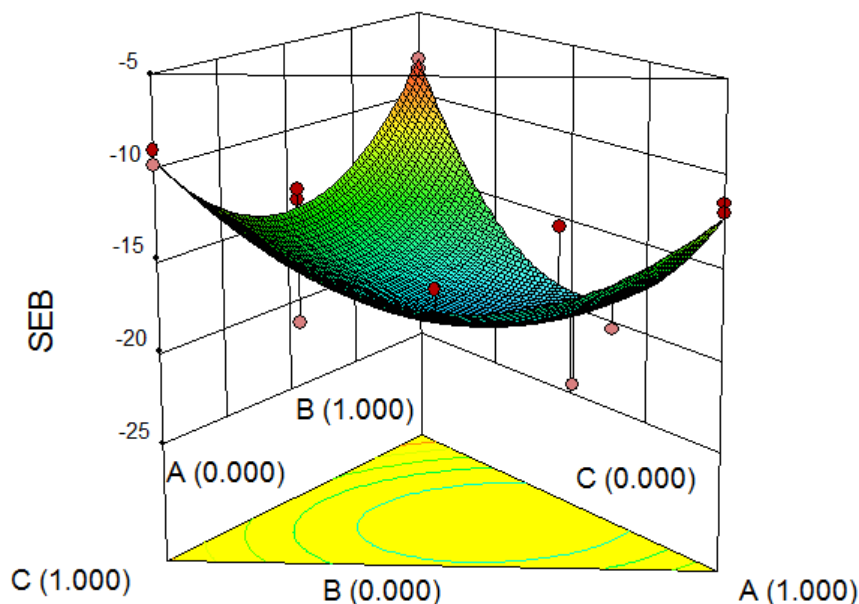
همانطور که در جدول ۱۱ مشخص است فعالیت آنتی-انتروتوکسین‌زایی عصاره‌ها در حالت مخلوط نسبت به تیمارهای انفرادی (تیمار ۵، ۶ و ۸) بیشتر می‌باشد. در میان تیمارها بیشترین کاهش بیان ژن برای هر دو ژن تیمار ۱۵ (۶۷ درصد عصاره مرزنجوش، ۱۶ درصد عصاره فوفل و ۱۷ درصد عصاره دارفلفل) بود. عملکرد سینرژیستی بین عوامل ضد میکروبی عصاره‌های می‌تواند عامل اصلی بالا بودن فعالیت آنتی‌انتروتوکسینی عصاره‌ها در حالت مخلوط باشد. بطور مشابه یک عملکرد سینرژیستی بین نایسین و عصاره آویشن شیرازی علیه تولید انتروتوکسین C و آلفاهمولایزین *S. aureus* توسط پارسایی مهر و همکاران مشاهده شده است.

شکل بیشترین کاهش بیان ژن *seb* بواسطه غلظت‌های پایین جزء دارفلفل مشاهده شده است. با افزایش غلظت‌های هر سه عصاره میزان ممانعت از بیان ژن ابتدا بالا رفته ولی در ادامه در غلظت‌های بالای هر یک از عصاره میزان بیان ژن افزایش می‌یابد.

اثر متغیرهای مستقل بر میزان بیان ژن *seb* مخلوط عصاره‌ها نسبت به هر یک از عصاره‌ها به تنهایی علیه بیان ژن *seb* فعالیت آنتی‌انتروتوکسینی بیشتری داشت. در غلظت‌های بالای هر یک از عصاره‌ها، کمترین و بیشترین اثر بر بیان ژن *seb* را به ترتیب عصاره‌های مرزنجوش و فوفل داشتند (شکل ۴). با این حال مطابق



شکل ۳- اثر اجزای مخلوط بر بیان ژن *sea* (دارفلفل (*C)، فوفل (*B)، مرزنجوش (*A))



شکل ۴- اثر اجزای مخلوط بر بیان ژن *seb* (دارفلفل (*C)، فوفل (*B)، مرزنجوش (*A))

کیو و همکاران (۲۰۰۷) و اسمیت پالمر و همکاران (۲۰۰۴) نیز به نتایج مشابهی به ترتیب برای غلظت‌های

تحت بازدارنده عصاره تیمول و عصاره‌های مختلف گیاهی در مقابل تولید انتروتوکسین‌های A و B. *S. aureus* رسیدند.

مطالعات اخیرا نشان داده است که حضور باکتری در محیط حاوی غلظت‌های پایین آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند سبب افزایش احتمال مقاومت یا بقای ایزوله جهش‌یافته و مقاوم گردد. دوز پائین آنتی بیوتیک‌ها از سه طریق می‌تواند اثر خود را اعمال کنند:

- بالا بردن توانایی باکتری برای کسب مقاومت
 - ایجاد کننده تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی
 - تحت تاثیر قرار دادن فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف باکتری نظیر بیان ژن‌های ویروالانس
- علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که امکان ایجاد جهش در دوز subMIC بیشتر از دوز کشنده (Lethal) اتفاق می‌افتد به این دلیل که وقتی یک جمعیت حساس با غلظت Lethal از یک ماده آنتی باکتریایی مواجه می‌شوند تنها آن دسته از باکتری‌هایی که مقاوم هستند پایدار مانده و بقیه از بین می‌روند در حالی که آن دسته از باکتری‌هایی که با دوزهای sub MIC ماده آنتی باکتریایی مواجه می‌شوند این دوز تنها موجب کاهش سرعت رشد آنها شده و قابلیت باکتری را برای کسب مقاومت در برابر مواد آنتی-باکتریایی بالا می‌برد. مطالعات نشان می‌دهد که غلظت‌های sub MIC مواد آنتی باکتریایی می‌تواند موجب انتقال سیگنال‌هایی بین یک و یا جنس‌های مختلف باکتری‌ها شود که می‌تواند بر بیان ژن‌های ویروالانس باکتری و کوآروم سنسینگ⁷ تاثیرگذار باشد (اندرسون و هوگز، ۲۰۱۴).

پارسایی‌مهر و همکاران (۲۰۱۴) اثر اسانس آویشن شیرازی^۸ بر بیان ژن SEC بررسی و گزارش نمودند که این اسانس در غلظت ۰/۰۰۵ درصد اثر ممانعت‌کننده‌ای بر تولید SEC ندارد ولی با افزایش غلظت اسانس تا ۰/۰۱۵

درصد یک اثر ممانعت‌کننده مشاهده شد. مقایسه بیان نسبی ژن SEC در نمونه شاهد و تیمارها نشان داد که غلظت‌های ۰/۰۰۷۵ و ۰/۰۱۵ درصد این اسانس به ترتیب ۱۰/۷ و ۲۳/۸ مرتبه بیان این ژن را کاهش می‌دهند. ایون و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که در یک محیط کشت مخلوط *Lactococcus lactis* اثر ممانعت‌کننده بر رشد *S. aureus* دارد و علاوه بر این مشاهده نمودند که تولید فاکتورهای بیماری‌زای *S. aureus* مثل لوکوس agr، sarA و برخی انتروتوکسین‌ها در حضور این باکتری کاهش می‌یابد.

بهینه‌یابی مخلوط عصاره

در فرایند بهینه‌یابی، اهمیت پاسخ‌های بیان ژن‌های *sea* و *seb* یکسان در نظر گرفته شد و بهینه‌یابی با تکنیک بهینه‌سازی عددی انجام شد. مخلوطی از عصاره‌ها شامل ۴۷ درصد مرزنجوش، ۲۶ درصد فوفل و ۲۷ درصد دارفلفل به‌عنوان مخلوط بهینه علیه بیان ژن‌های *sea* و *seb* یافت شد که مطلوبیت ترکیبی این مخلوط ۷۹ درصد بود. مقادیر بیان ژن برای بیان ژن‌های *sea* و *seb* *S. aureus* تیمار شده با مخلوط بهینه به ترتیب ۱۷/۹۹- و ۱۹/۷۵- پیش‌بینی شد و در شرایط آزمایشی به ترتیب ۱۷/۰۵- و ۱۸/۸۶- مشاهده گردید که این پاسخ‌ها به مقادیر پیش‌بینی‌شده نزدیک بود. این نزدیکی نتایج تجربی و پیش‌بینی‌شده نشان دهنده‌ی دقت بالای مدل‌های مخلوط برای برآورد بیان ژن‌های *sea* و *seb* *S. aureus* است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش در مرحله اول فعالیت ضد میکروبی سه عصاره مرزنجوش، دارفلفل و فوفل مورد بررسی قرار گرفت که در میان عصاره مرزنجوش بیشترین فعالیت ضد میکروبی را نشان داد. از سوی دیگر در میان باکتری‌های مورد آزمون باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت باکتری‌های گرم منفی داشتند. عصاره‌های مرزنجوش، دارفلفل و فوفل اثر سینرژیستی بر یکدیگر علیه بیان ژن انتروتوکسین‌های A و B *S.*

⁷Quorum sensing

⁸*Zataria multiflora* boiss.

- vaccum packed ham. Int. J. Food Microbiol. 73(1):83-92.
8. Josephs-Spaulding J., Beeler E., and Singh O.V. 2016. Human microbiome versus food-borne pathogens: friend or foe. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100(11): 4845-63.
 9. Lee S.E., Park B.S., Kim M.K., Choi W.S., Kim H.T., Cho K.Y., ... and Lee H.S. 2001. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. J. Crop Prot. 20(6): 523-8.
 10. Mansour M. and Millière J.B. 2001. An inhibitory synergistic effect of a nisin-monolaurin combination on *Bacillus* sp. vegetative cells in milk. Food Microbiol. 18(1): 87-94.
 11. Naghmouchi K., Drider D., Baah J. and Teather R. (2010). Nisin A and polymyxin B as synergistic inhibitors of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Probiotics Antimicrob. Proteins. 2(2): 98-103.
 12. Parsaeimehr M., Akhondzadeh Basti A., Misaghi A., Gandomi H. and Jebellijavan A. 2015. The Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on Gene Expression of Enterotoxin C in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. J. Food Process. Pres. 39(6): 1702-9.
 13. Qiu J., Wang D., Xiang H., Feng H., Jiang Y., Xia L. and Deng X. 2010. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and α -hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. PloS one. 5(3): e9736.
 14. 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 α -toxin by *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 53(10): 1023-7.
 15. Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant
- aureus* داشتند. مخلوطی از عصاره‌ها شامل ۴۷ درصد عصاره مرزنجوش، ۲۷ درصد عصاره دارفلفل و ۲۶ درصد عصاره فوفل بیشترین فعالیت آنتی‌انتروتوکسین‌زایی را نشان داد.
- منابع
1. Andersson D.I., and Hughes D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. Nat. Rev. Microbiol., 12(7): 465-78.
 2. Arqués J.L., Rodríguez E., Gaya P., Medina M., Guamis B., and Nunez M. 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. 98(2): 254-60.
 3. Azizkhani M., Misagh A., Basti A.A., Gandomi H. and Hosseini H. (2013). Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Int. J. Food Microbiol. 163 (2013) 159-65.
 4. Burt S. 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods, a Review. Int. J. Food Microbiol. 94:223-53.
 5. Buruk Sahin Y., Aktar Demirtaş E. and Burnak N. 2016. Mixture design: A review of recent applications in the food industry Mixture design: A review of recent applications in the food industry Mixture design: A review of recent applications in the food industry. Pamukkale Uni. J. Eng. Sci. 22(4).
 6. Deans S.G., and Svoboda K.P. 1990. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. Flavour Frag. J. 5(3): 187-90.
 7. Gill A.O., Delaguis P., Russo P. and Holley R.A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on

- essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Food Microbiol.* 26:118-22.
16. Zhang L.L., Xu M., Wang Y.M., Wu D.M. and Chen J.H. 2010. Optimizing ultrasonic Ellagic Acid extraction conditions from Infructescence of *Platycarya strobilacea* using response surface methodology. *Molecules*.15: 7923-32.

Introducing an optimal mixture of *Origanum majorana*, *Long pepper*, and *Areca* extracts with the highest level of activity against gene expression of A and B *Staphylococcus aureus* enterotoxins

Naddafi S.J¹, Mohammadi Sani A^{1*}, Ataye Salehi E¹, Karazhyan R²

1. Department of food science and technology, Quchan branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

2. Industrial microbial biotechnology department ACECR, Mashhad, Iran.

*Corresponding author: mohamadisani@yahoo.com

Received: 09 June 2021

Accepted: 07 October 2021

Abstract

With the growing awareness of the importance of natural extracts with antimicrobial and antioxidant properties, today the food industry is looking for the use these compounds instead of synthetic preservatives. To date, no research has been done to find an optimal mixture of *Origanum majorana*, *Long pepper*, and *Areca* extracts against the gene expression of A and B enterotoxins of *S. aureus*. Therefore, in this study, we are seeking to provide a mixture of these extracts with the highest anti-enterotoxigenic activity using real-time PCR and mixture statistical methods. If successful, we introduce these extracts as an antagonist against the growth of pathogenic bacteria and the gene expression of enterotoxin of *S. aureus*. In the first stage, the antimicrobial activity of *Origanum majorana*, *Long pepper*, and *Areca* extracts was studied, which *Origanum majorana* had the highest antimicrobial activity among them. On the other hand, among the tested bacteria, gram-positive bacteria were more sensitive than gram-negative bacteria. The tested extracts had a synergistic effect on each other against the gene expression of A and B enterotoxins of *S. aureus*. The mixture of extracts including 47% *Origanum majorana* extract, 27% *Long pepper* extract and 26% *Areca* extract showed the highest activity against the gene expression.

Keywords: Natural extracts; Antibacterial; Anti-enterotoxigenic; Real-time PCR.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.