

# Enterotoxinas y enzimas estafilococcicas en presencia de aceites esenciales

*Staphylococcal enterotoxins and enzymes in presence of essential oils*

NUÑEZ L, MORO A, D'AQUINO M

Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires,  
Junín 954, (1153) Buenos Aires, Argentina.  
e-mail: lidian@huemul.ffyb.uba.ar – midaki@ffyb.uba.ar

## RESUMEN

Nuestro objetivo fue investigar el efecto de concentraciones subinhibitorias de clavo, canela, y tomillo en el crecimiento de *S. aureus* y en la producción de coagulasa, termonucleasa y enterotoxina. Con ese fin se agregaron diferentes concentraciones de los aceites esenciales a Caldo Cerebro Corazón. La producción de enterotoxina en presencia y en ausencia de los aceites esenciales se determinó por la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA). Nuestros resultados indican que bajas concentraciones que no afectan el crecimiento, reducen la producción de la producción de las enzimas ensayadas y de enterotoxina. El aceite esencial de tomillo es el que presenta mayor actividad pues al 0,04% produce la pérdida de la actividad de ambas enzimas y de la enterotoxicidad. Esto es importante cuando consideramos su potencial aplicación en alimentos y en la industria farmacéutica.

PALABRAS CLAVE: Clavo de olor. Canela. Tomillo. *Staphylococcus aureus*. Actividad enzimática. Enterotoxina.

## ABSTRACT

*Our aim was to investigate the effect of subinhibitory concentrations of clove, cinnamon, and thyme essential oils on the growth of Staphylococcus aureus and its production of coagulase, thermonuclease and enterotoxin. Different concentrations of the essential oils were added to Brain Heart Infusion broth. The production of enterotoxin in the presence or absence of essential oils was estimated using the ELISA technique. Our results indicate that a lower concentration did not affect the growth S. aureus but reduced the production of metabolites. Thyme oil presents the most significant effect, inhibiting the activity of both enzymes and the production of enterotoxin with 0,04%. There is a renewed interest in the potential application of these essential oils in the food and pharmaceutical industries to control staphylococcal poisoning.*

KEY WORDS: Clove. Cinnamon. Thyme. *Staphylococcus aureus*. Enzymatic activity. Enterotoxin.

Fecha de recepción: 09-05-07

Fecha aceptación: 28-06-07

## INTRODUCCION

Las propiedades antimicrobianas de las especias son reconocidas desde la antigüedad. Actualmente hay un mayor interés en el estudio de estos productos, en especial aceites esenciales, en la industria alimenticia y farmacéutica<sup>1,2,3</sup>. Además, diversos estudios examinaron el efecto de antimicrobianos de origen vegetal sobre enzimas extracelulares y factores de virulencia

## INTRODUCTION

The antimicrobial properties of herbs and spices have been widely recognized for several thousand years. There is at present a renewed interest in these products, in particular essential oils, both in the food and pharmaceutical industries<sup>1,2,3</sup>. Research described in literature also shows that essential oils have the ability to alter bacterial pathogenicity and specially toxin production. Tran-

de *Staphylococcus aureus*. Tranter (1993)<sup>4</sup> demostró que concentraciones bajas de oleuropeína reducen la producción de enterotoxina tipo B; El trabajo de González-Fandos y col. (1994)<sup>5</sup> demostraron la influencia del polvo de ajo en la producción de enterotoxina de *Staphylococcus aureus*. Nostro (2001)<sup>6,7</sup> también evaluó la actividad del extracto de *Helichrysum italicum*, cuyos resultados indicaron que el mismo ejerce un efecto inhibitorio sobre enzimas como coagulasa, DNasa, termonucleasa, y lipasa. Concentraciones subinhibitorias de aceites esenciales como clavo, laurel, canela, nuez moscada y tomillo de reducen significativamente la producción de listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*<sup>8</sup>.

El *Staphylococcus aureus* es un patógeno extremadamente versátil que causa un gran número de enfermedades que incluyen el síndrome de shock tóxico, síndrome de piel escaldada y enfermedades alimentarias. La patogenicidad de *Staphylococcus aureus*, como típica bacteria Gram-positiva, depende de un conjunto de proteínas asociadas a la pared celular y extracelulares (catalasa, coagulasa, termonucleasa, hemolisinas y enterotoxinas), por lo tanto, la patogenicidad estafilocócica es multifactorial<sup>9</sup>. Muchos de estos factores, incluyendo las exotoxinas son factores de virulencia que pueden producir enfermedades tanto en humanos como en animales. La intoxicación estafilocócica alimentaria es una de las principales causas de gastroenteritis; la cual se produce por la ingestión de una o más enterotoxinas (SEs) en alimentos contaminados con *Staphylococcus aureus*<sup>10</sup>. La acción emética se produce por activación del centro emético cerebral. Su función primaria in vivo es inhibir la respuesta inmune a *S. aureus*. Las toxinas con actividad de superantígeno (SAg) comprenden las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), TSS toxina-1 (TSST-1), estafilocócicas (SEs), TSS toxina-1 (TSST-1). La coagulasa se une a la protrombina humana en una relación molar 1:1 dando lugar a la formación del complejo staphylothrombina, el cual convierte fibrinógeno en fibrina. La termonucleasa (Tnasa) hidroliza las cadenas simple o doble de DNA y RNA en la posición 5' de las uniones fosfodiéster por un mecanismo dependiente de calcio<sup>11</sup>.

Este trabajo estudia el efecto de concentraciones subinhibitorias de tres aceites esenciales en la producción de coagulasa, termonucleasa y enterotoxinas estafilocócicas.

ter (1993)<sup>4</sup> reported that a low concentration of phenolic compounds of natural origin (oleuropein) inhibited the production of enterotoxin B by *S. aureus* S-6. The work of González-Fandos *et al.* (1994)<sup>5</sup> demonstrated the influence of garlic on enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*. Assays indicated that subinhibitory concentration of *Helichrysum italicum* extract also inhibited the enzymatic activity and production of enterotoxins by *S. aureus*<sup>6,7</sup>. Five plant essential oils —bay, clove, cinnamon, nutmeg, and thyme— significantly reduced the production of listeriolysin O by *Listeria monocytogenes*<sup>8</sup>.

*Staphylococcus aureus* is an extremely versatile pathogen that causes a wide range of disease states including toxic shock syndrome, scalded skin syndrome and foodborne illness. As is typical of gram-positive bacteria, its pathogenicity is multifactorial, depending largely on a set of extracellular and cell wall-associated proteins (catalase, coagulase, the mononuclease, haemolysins, enterotoxins)<sup>9</sup>. Many of these factors, including the exotoxins, are virulence factors that have been implicated both in human and animal diseases. Staphylococcal food poisoning ranks worldwide as one of the most prevalent causes of gastroenteritis. It results from ingestion of one or more preformed staphylococcal enterotoxins in staphylococcus-contaminated food. The emetic response is dependent on activation of the medullary emetic center of the brain. Their primary function in vivo may be to inhibit host immune response to *S. aureus*. Toxic shock syndrome toxin-1 and the staphylococcal enterotoxins are also known as pyrogenic toxin superantigens<sup>10</sup>. Coagulase binds with human prothrombin in 1:1 molar relation to form a complex named staphylothrombin, which can convert fibrinogen to fibrin. Thermostable nuclease hydrolyzes single or double stranded DNA and RNA at the 5' position of phosphodiester bonds by a calcium-dependent mechanism<sup>11</sup>.

This study investigated the ability of subinhibitory concentration of three plant essential oils to decrease the production of coagulase, thermostable nuclease and staphylococcal enterotoxins.

## MATERIAL Y METODOS

### *Microorganismo*

Se trabajó con una cepa de *Staphylococcus aureus* toxigénico, aislada de un alimento. La cepa se mantuvo en estrías de agar Tripteína Soja a 4°C, y se repicó cada cuatro a seis semanas. El microorganismo se sembró en caldo Cerebro Corazón (37°C-18h), luego de lo cual se repicó en Agar Infusión Cerebro Corazón y se incubó 18 h a 37°C. El inóculo se preparó suspendiendo el crecimiento bacteriano en agua peptonada al 0,1 %.

### *Aceites esenciales*

Se trabajó con aceites esenciales de clavo (*Eugenia caryophyllata*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) de origen comercial, marca Fritzsche S.A.I.C.A. (Buenos Aires, Argentina) (grado alimentario). Los aceites esenciales se utilizaron diluidos al 50 % (v/v) en PPG en concentraciones por debajo de la concentración inhibitoria mínima (CIM):

Clavo de olor: 0,05 % - 0,04% - 0,075 %

Tomillo: 0,01% - 0,02% - 0,04% - 0,05 %  
- 0,075 %

Canela: 0,01% - 0,02% - 0,04 % - 0,05 %  
- 0,075 %

### *Efecto de las esencias en el crecimiento y en los factores de virulencia de Staphylococcus aureus*

A frascos conteniendo 50 ml de Caldo Cerebro Corazón con agar al 0.15 %, se agregaron las esencias en las diferentes concentraciones; se incubó una hora a 37°C con agitación antes de inocularlos con la suspensión bacteriana de forma tal de obtener una concentración inicial de 10<sup>5</sup> células/ml, además se inoculó un frasco control sin esencia. Se incuban por 2 días a 37°C.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0,24,48h) y se determinó el recuento bacteriano, la actividad de coagulasa, termonucleasa y la presencia de enterotoxina. Las muestras recogidas para la detección de termonucleasa y enterotoxina se centrifugaron a 12.000g, durante 10 min a 5°C, y el sobrenadante se guardó a -30°C para su posterior análisis.

## MATERIAL AND METHODS

### *S. aureus culture*

This study was performed on toxigenic *S. aureus* isolated from food. Stock cultures were maintained on Tryptone Soya agar slopes a 4°C and subcultured every 4-6 weeks. The working culture was obtained by inoculating Brain Heart Infusion broth; it was incubated at 37°C for 18 hours and then replicated in Brain Heart Infusion agar in the same conditions. The inoculum was prepared by suspending bacterial growth in 0.1% peptone water.

### *Essential oils*

Essential oils (food grade) derived from clove (*Eugenia caryophyllata*), thyme (*Thymus vulgaris*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) were kindly supplied by Fritzsche S.A.I.C.A. (Buenos Aires, Argentina). The oils were dissolved in PPG (50% v/v) at subinhibitory concentrations:

Clove: 0.05% - 0.04% - 0.075%

Thyme: 0.01% - 0.02% - 0.04% - 0.05% -  
0.075%

Cinnamon: 0.01% - 0.02% - 0.04% - 0.05%  
- 0.075%

### *Effect of essential oils on S. aureus growth and metabolite production*

Brain Heart Infusion broth was supplemented with agar to a final concentration of 0.15% w/v. Subinhibitory concentrations of essential oils were added aseptically to flasks containing 50 ml of BHI. *S. aureus* strain was then added to one flask and to a control flask without essential oil, obtaining an initial level of 10<sup>5</sup> CFU/ml. All cultures were incubated at 37°C for 2 days.

Samples were withdrawn from flasks at intervals of 0, 24 and 48 hours, and determinations of CFU/ml, enterotoxin, coagulase and thermonuclease were performed. Samples for thermonuclease and enterotoxin detection were centrifuged for 10 minutes at 12.000g at 5°C, and frozen at -30°C for later analysis. Percentages of inhibition were calculated using the following formula:

Los porcentajes de inhibición fueron calculados usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\log \text{ ufc/ml en caldo sin esencia} - \log \text{ ufc/ml en caldo con esencia}) \times 100}{(\log \text{ ufc/ml en caldo sin esencias})}$$

Cada ensayo se efectuó tres veces y cada muestra se realizó por duplicado.

#### *Recuento de viables*

Se realizaron diluciones seriadas de las muestras en agua peptonada al 0,1%. Se sembró 0,1 ml de la dilución apropiada en superficie en Triptona Soja Agar por duplicado; las cuales se incubaron 48h a 37°C.

#### *Ensayo de coagulasa*

Para este ensayo se tomaron muestras a las 24hs. La producción de coagulasa se determinó utilizando la prueba en tubo de ensayo, para ello se agregó 0,1 ml de los cultivos a 0,3 ml de plasma de conejo liofilizado reconstituido en tubos y se incubó durante 4hs. a 37°C. Los tubos se examinaron durante la incubación a cada hora y los negativos se dejaron 20 hs más. La reacción se interpretó de acuerdo a Sperber (1975)<sup>12</sup>: la reacción 4+ es un coágulo bien firme, que no se desplaza al invertir el tubo; en la reacción 3+ y 2+ se observa el coágulo en mayor o menor extensión pero no abarca toda la columna del líquido; en la reacción 1+ se observa pequeños coágulos desorganizados.

#### *Ensayo de termonucleasa*

La actividad de termonucleasa se determinó por el método de Lachica (1971)<sup>13</sup>. Se utilizaron placas preparadas con Agar Termonucleasa w/ Toluidine Blue. En cada placa se realizó seis pocillos en el agar con un diámetro de 2 mm. Antes del ensayo el sobrenadante se calentó en un baño a ebullición durante 15 min y se ajustó el pH a 10, luego, se sembraron dos gotas en cada pocillo. Las placas se incubaron a 35°C y se examinó la actividad de termonucleasa después de 4 y 24 hs; se midió el diámetro del halo rosado con un micrómetro.

$$\frac{(\log \text{ cfu/ml in oils-free broth} - \log \text{ cfu/ml in broth with oil}) \times 100}{(\log \text{ cfu/ml in oils-free broth})}$$

Each experiment was performed twice and assayed in duplicate.

#### *Viable counts*

Samples were serially diluted in peptone water 0.1%; 0.1 ml of each dilution were placed on the surface of a tryptone soya agar plate in duplicate. Plates were then incubated at 37°C for 48 hours.

#### *Determination of coagulase activity*

Samples were taken after 24 hours. The coagulase tube test was performed by adding 0.1 ml of the culture to 0.3 ml of coagulase plasma in the tube. After gentle mixing, the test was placed in an air incubator at 35°C and examined after 2, 4 and 24 hours. Reactions were interpreted according to Sperber (1975)<sup>12</sup>. The 4+ reaction is a considerably firm, opaque clot, which remains in place when the tube is tipped on its side. The typical 3+ and 2+ reactions that we encountered were not as opaque as the 4+ reaction, and were surrounded by clear plasma. The 1+ reaction showed small disorganized clots.

#### *Thermonuclease assay*

Thermonuclease activity was determined by the method of Lachica (1971)<sup>13</sup>. We used plates prepared with Agar Thermonuclease w/ Toluidine Blue. Six wells with a diameter of 2 mm were made in each plate. Before testing, each supernatant fluid was heated in a boiling bath for 15 minutes and its pH was adjusted to 10. Wells were then filled with culture. Heat-stable nuclease activity was signalled by bright pink zones of DNA hydrolysis, discernible after 4 to 24 hours of incubation at 37°C; the diameter of the pink halo was measured with a micrometer.

### *Detección de enterotoxina*

La producción de enterotoxina en presencia o en ausencia de las esencias estudiadas se determinó por medio de un ensayo inmunoenzimático realizado en una configuración sándwich.

### *Efecto directo de los aceites esenciales en la actividad de coagulasa y termonucleasa*

A diferentes alícuotas del sobrenadante de un cultivo de *S. aureus* en BHI se agregaron las esencias hasta alcanzar las concentraciones subinhibitorias de cada aceite esencial. Todos los tubos son incubados a 37° C durante 1 h con agitación constante; luego, se dejaron 15 min en reposo para que se separen las fases y se retiraron las muestras para realizar los ensayos de coagulasa y termonucleasa.

## RESULTADOS

### *Crecimiento de Staphylococcus aureus*

El efecto de concentraciones subinhibitorias en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se observa en la tabla 1. Los aceites esenciales usados al 0,075% producen aproximadamente un 50% de inhibición, aunque, el tomillo al 0,04% ya logra ese nivel de inhibición después de 48h de incubación.

### *Detection of enterotoxin*

The production of this toxin in the presence and absence of essential oils was detected by sandwich ELISA.

### *Direct effect of essential oils on enzymatic activity*

Samples of essential oils were added to supernatant from *S. aureus* cultured in BHI to achieve subinhibitory concentrations of each oil. All tubes were incubated at 37°C for 1 hour with constant mixing. Samples were then left to settle for 15 minutes, allowing the separation of plant essential oils. Samples were removed and enzymatic activity was measured as before.

## RESULTS

### *Growth of S. aureus*

The effect of subinhibitory concentrations of essential oils on the growth of *S. aureus* is shown in Table 1. After 24-hour incubation, 0.075% of essential oils caused a 50% inhibition, although 0.045% of thyme reached that level of inhibition after a 48-hour incubation.

**TABLA 1.** Efecto de los aceites esenciales en el crecimiento de *S. aureus*.**TABLE 1.** Effect of essential oils on growth of *S. aureus*.

Concentración (%) <i>Concentration (%)</i>	Porcentaje de inhibición <i>Percentage of inhibition</i>	
	Tiempo de incubación (h) <i>Time of incubation (h)</i>	
	24	48
Clavo de olor <i>Clove</i>		
0,04	25	25
0,05	27	27
0,075	46	50
Canela <i>Cinnamon</i>		
0,01	1	0.5
0,02	6	5
0,04	17	14
0,05	33	40
0,075	48	51
Tomillo <i>Thyme</i>		
0,01	1	1
0,02	2	9
0,04	35	59
0,05	40	60
0,075	41	61

### *Producción de coagulasa*

La concentración de los aceites esenciales en el medio tiene un marcado efecto en la producción de coagulasa (Tabla 2). Por encima de 0.01% de aceite de canela y tomillo ya se observan alteraciones en la producción de coagulasa, sin inhibición significativa del crecimiento. Los tres aceites producen una completa inhibición al 0.05%.

### *Coagulase production*

The concentration of essential oils in the culture medium had an effect on coagulase production (Table 2). Concentrations of cinnamon and thyme oils above 0.01% already reduced coagulase production, without significant inhibition of growth. All three oils caused a complete inhibition at 0.05%.



**TABLA 2.** Efecto de los aceites esenciales en la producción de coagulasa.  
**TABLE 2.** Effect of essential oils on coagulase production.

Concentración (%) Concentration(%)	Clavo Clove	Tomillo Thyme	Canela Cinnamon
0	++++	++++	++++
0,01	++++	++	++
0,02	++++	++	++
0,04	++	(-)	++
0,05	(-)	(-)	(-)
0,075	(-)	(-)	(-)

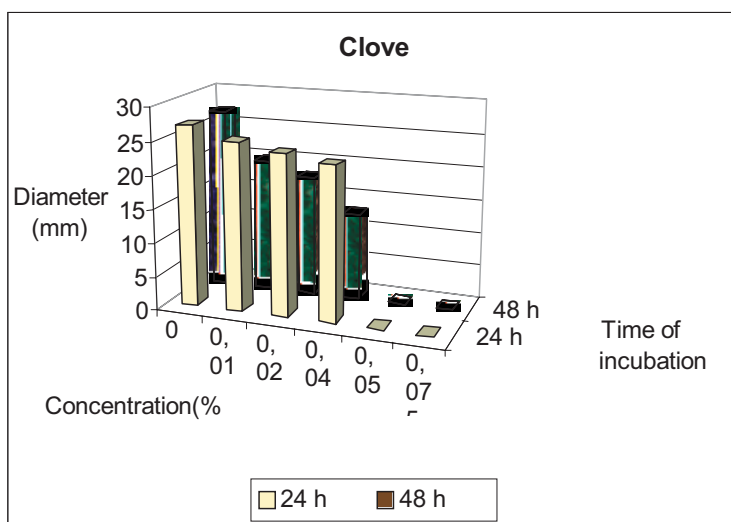
*Producción de termonucleasa*

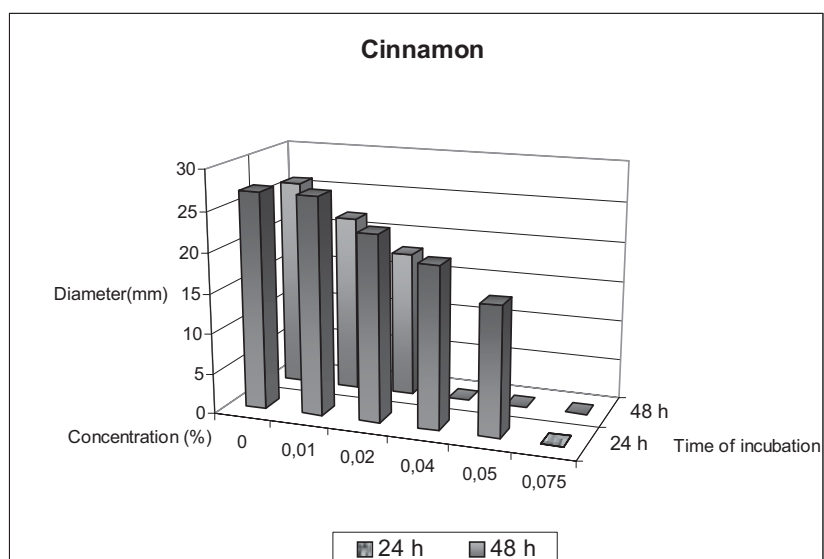
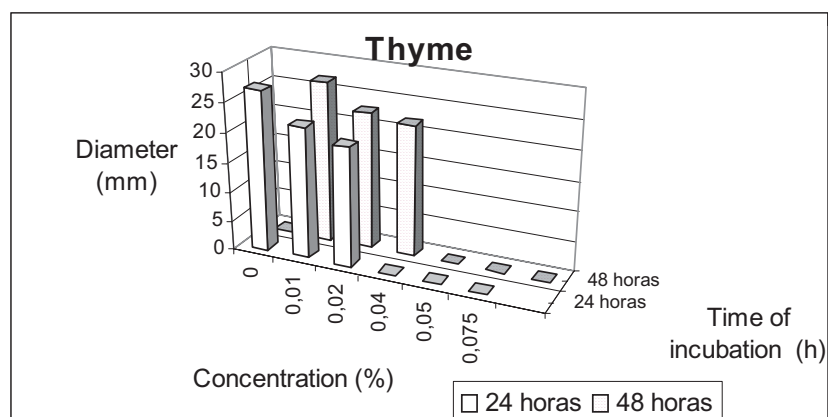
La acción en la actividad de la termonucleasa se observa en la Figura 1. Después de 48h de incubación, los niveles de la enzima en los frascos que contienen las esencias son inferiores al del frasco control. Al 0,05 % las tres esencias producen una completa inhibición de la producción de termonucleasa. El aceite de tomillo es el que produce mayor efecto inhibitorio, desde concentraciones de 0,04 %.

*Thermonuclease production*

The effect on thermonuclease activity is shown in Figure 1. After 48 hour-incubation, the level of enzyme in flasks containing essential oils was always lower than those in control flasks. All three oils at 0.05% produced a complete inhibition of thermonuclease. Thyme oil reached the highest inhibition effect at 0.04%.

**FIGURA 1.** Efecto de los aceites esenciales en la síntesis de termonucleasa estafilococcica.  
**FIGURE 1.** Effect of essential oils on staphylococcal thermonuclease synthesis.





### *Síntesis de enterotoxina*

En la Tabla 3 se observa la producción de enterotoxina en presencia de los aceites esenciales. A las 48 horas de incubación, no se detecta la enterotoxina en caldos con niveles por encima de 0,04% de las esencias de tomillo y canela.

### *Enterotoxin synthesis*

Table 3 shows the effect of essential oils on enterotoxin production. After a 48-hour incubation time, 0.04% of thyme and cinnamon oil completely inhibited production.



**TABLA 3.** Efecto de los aceites esenciales en la producción de enterotoxina  
**TABLE 3.** Effect of essential oils staphylococcal enterotoxin production

Concentración (%) Concentration (%)	Clavo <i>Clove</i>	Canela <i>Cinnamon</i>	Tomillo <i>Tyme</i>
	48 h of incubation		
0	+	+	+
0,01	+	+	+
0,02	+	+	+
0,04	+	-	-
0,05	+	-	-
0,075	-	-	-

*Efecto directo de las esencias en la actividad enzimática*

Los aceites esenciales muestran un efecto directo en la inhibición de la actividad de la coagulasa pero no así en la actividad de la termonucleasa presentes en los sobrenadantes del cultivo en BHI sin esencias (Tabla 4).

*Direct effect of essential oils on enzymatic activity*

The essential oils were shown to directly inhibit coagulase activity present in supernatant from cells cultured in BHI without essential oils, while thermonuclease was not affected (Table 4).

**TABLA 4.** Efecto directo de los aceites esenciales en la actividad enzimática.  
**TABLE 4.** Direct effect of essential oils on enzymatic activity.

Aceites esenciales <i>Essential oils</i>	Coagulasa <i>Coagulase</i>	Termonucleasa <i>Thermonuclese</i>
Clavo <i>Clove</i>	( - )	23 *
Tomillo <i>Thyme</i>	( - )	22
Canela <i>Cinnamon</i>	( - )	22
Control	++++	23

\* Diámetro (mm) del halo (hidrólisis de DNA).

\*Diameter (mm) del halo (hidrólisis de DNA).

**DISCUSIÓN**

Los resultados de la Tabla 1 muestran que los tres aceites esenciales utilizados tienen un poder de inhibición del crecimiento microbiano similar pues con 0,075% se obtienen niveles de inhibición del 50% y que la sensibilidad del microorganismo aumenta con la concentración de la esencia. Similares resultados, obtuvo Hili (1997)<sup>14</sup> al ensayar la actividad antimicrobiana de diferentes esencias frente a *S aureus* y otras bacterias.

**DISCUSSION**

Results in Table 1 show that the three essentials oils had similar inhibition properties on microbial growth, considering that the inhibition level rose to 50% with a concentration of 0.075%, and that sensitivity increased with essential oil concentration. Similar results were reported by Hili (1997)<sup>14</sup> after testing the antimicrobial activity of different essential oils on *S. aureus* and other bacteria.

Las concentraciones subinhibitorias de las esencias de clavo, tomillo y canela, afectan enzimas y enterotoxinas que contribuyen a la patogenicidad de *S. aureus*.

El aceite esencial de tomillo es el que presenta mayor actividad pues al 0,04%, con una inhibición del crecimiento del 35%, produce la pérdida de la actividad de ambas enzimas y de la enterotoxicidad (Tabla 2, 3 y Fig 1); la inhibición producida tiene un efecto general, alterando la producción de las tres exoproteínas del mismo modo.

Las concentraciones del aceite de clavo ensayadas que producen la inhibición de la coagulasa, también producen la pérdida de la termonucleasa, pero no de la enterotoxina.

Sin embargo la esencia de canela con concentraciones que apenas producen una inhibición del orden del 10% anula la actividad de la enterotoxina, de la termonucleasa y altera la coagulasa. Esto indica que de las esencias ensayadas es la que posee mayor actividad frente a los productos microbianos estudiados sin afectar el crecimiento bacteriano.

Los resultados demostraron que las esencias de canela y tomillo influyen en mayor grado en la producción de los factores de virulencia que la esencia de clavo.

En general, la termonucleasa es detectada siempre que la toxina está presente; salvo en el caso, del aceite de clavo al 0,05% donde no se detectó la enzima pero sí la enterotoxina. Esta misma situación, la observó González-Fandos y col. (1994)<sup>5</sup>, al estudiar el efecto del ajo deshidratado en la producción de termonucleasa y enterotoxinas, con lo que se puede inferir que la termonucleasa no siempre es un indicador seguro del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxina.

El efecto del aceite de clavo en la producción de enterotoxina, se explica en parte, por estar relacionada, la síntesis de la enterotoxina con el crecimiento microbiano, pues recién inhibe su producción con un porcentaje de inhibición del crecimiento del orden del 50 %.

La adición de aceites esenciales al sobrenadante de un cultivo de *Staphylococcus aureus* en BHI inactivó la coagulasa, lo que nos indica una interacción directa de las esencias con la enzima, en cambio, no se inhibe la actividad de la termonucleasa, con lo que podríamos concluir que la inhibición estaría probablemente a nivel de la producción de termonucleasa (Tabla 4).

The subinhibitory concentration levels of the three oils affected some enzymes and the enterotoxins that contribute to the pathogenic activities of *S. aureus*.

The thyme oil presented the most significant effect 35% of growth inhibition with 0.04% inhibiting the activity of both enzymes and the production of toxin (Tables 2, 3 and Figure 1). It had an overall inhibitory effect, altering the production of the three exoproteins in the same way.

The clove oil concentration that produced inhibition also caused the loss of thermonuclease but not of enterotoxin.

Concentrations of cinnamon which barely produced a 10% growth inhibition inactivated enterotoxin and thermonuclease activity, and altered coagulase production. This result indicates that cinnamon is the most active essence against the microbial metabolites assayed, without affecting bacterial growth.

The assays showed that cinnamon and thyme had a more significant influence in virulence factor production than clove.

In general, thermonuclease was detected whenever enterotoxin was present. However, the enzyme was not found in broth containing 0.05% of clove and detectable amounts of enterotoxin. Similar observations were reported by González-Fandos *et al.* (1994)<sup>5</sup>, who studied the effect of garlic powder on the production of thermonuclease and enterotoxins. Therefore, it can be pointed out that thermonuclease is not a sure indicator of *S. aureus* growth and enterotoxin production in food.

The effect of clove oil on the production of enterotoxin is partly explained because enterotoxin synthesis is related to growth, and its production is inhibited only after a growth inhibition of approximately 50%.

The addition of essential oils to a supernatant from *S. aureus* cultured in BHI without essential oils inactivated coagulase, but did not affect thermonuclease activity. This result indicates that oils would not interfere directly with coagulase activity, and that inhibition probably occurs at the level of thermonuclease production (Table 4).

As a result of their lipophilic property, essential oils are likely to act on the cytoplasmic membrane. The accumulation of lipophilic compounds in the cytoplasmic membrane of microorganisms has a considerable effect on the structural and

Estos aceites esenciales por su carácter lipofílico, actúan en la membrana citoplasmática; la acumulación sobre ésta de compuestos lipofílicos produce considerables efectos en las propiedades estructurales y funcionales de la misma, con un aumento de la permeabilidad celular. Las enzimas localizadas en la membrana son afectadas como resultado de la alteración producida<sup>15</sup>. Esto se correlaciona con estudios realizados sobre el mecanismo de acción del tomillo y el carvacrol, que demostraron que la inhibición del crecimiento se debía a daños producidos en la integridad de la membrana<sup>16</sup>.

Otra posible explicación es la alteración producida por estos aceites esenciales a nivel ribosomal; al penetrar en la membrana interactúan más fácilmente con los ribosomas unidos a membrana que con ribosomas citoplasmáticos. Las proteínas extracelulares son generalmente sintetizadas en ribosomas asociados a membrana mientras que las proteínas intracelulares son sintetizadas en ribosomas citoplasmáticos<sup>17</sup>.

functional properties of these membranes, which lose their integrity as they become increasingly permeable to protons and ions. Moreover, it has been found that enzymes in the membrane are also affected<sup>15</sup>. These results correlate with studies on the mode of action of thymol and carvacrol, which showed that such inhibition was due to damage in membrane integrity<sup>16</sup>.

Another possible explanation for the inhibition of toxin production is disruption at the ribosomal level. It is believed that extracellular proteins are generally synthesized on membrane-associated ribosomes, whereas intracellular proteins are synthesized on cytoplasmic ribosomes. Furthermore, components of plant essential oils actually penetrating the membrane would more readily interact with membrane-bound ribosomes than with cytoplasmic ribosomes<sup>17</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Arora DS, Kaur J. Antimicrobial activity of spices. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12: 237-262.
2. Chao SC, Young DG. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research* 2000;12: 639-649.
3. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308-316.
4. Tranter HS, Tassou SC, Nychas GJ. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.*1993, 74: 253-259.
5. González-Fandos E, García- López ML, Sierra ML, Otero O. Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and thermolabile synthesis in the presence of dehydrated garlic. *J. Appl. Bacteriol.*1994; 77: 49-552.
6. Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germanó MP, Alonzo V. Effect of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2001; 17: 517-520.
7. Nostro A, Cannatelli MA, Musolino AD, Procopio F, Alonzo V. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002; 35: 181-184.
8. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholine- specific production in *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51: 567- 574.
9. Novick RP. Pathogenicity factors and their regulation. In *Gram-Positive Pathogens*, Fischetti, VA. et al (ed.), pp.392-406. American Society for Microbiology, Washington, D.C.2000
10. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13: 16-34.
11. Jablonski LM, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ed. Doyle M, Beuchat LR, Montville TJ. ASM Press. Washington D.C.1997.
12. Sperber WH, Tatini SR. Interpretation of the coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 1975; 29: 502-505.
13. Lachica RVF, Genigeorgis C, Hoepflich. Metachromatic Agar - diffusion methods for detecting Staphylococcal Nuclease activity. *Appl. Microbiol.* 1971; 21: 585-587.
14. Hili P, Evans CS, Veness RG. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil *Lett. Appl. Microbiol.* 1997; 24: 269-275.
15. Sikkema J, De Bont J, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews.* 1995; 59: 201-222.
16. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas JE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91: 453-462.
17. Fishman Y, Rottem S, Citri N. Preferential suppression of normal exoenzyme formation by membrane- modifying agents. *J. Bacteriol.* 1980;114: 1435-1438.