Archive of SID

اثر سولفات منیزیم بر تندش اسپور، رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A

رمضانعلی عطائی کچوئی[۱]، غلامعلی قربانی[۲]، قربان بهزادیان نژاد[۳]، مرتضی ستاری[۳]، غلامحسین ریاضی[۴]

The effect of magnesium sulfate on spore germination, outgrowth and toxin production of Clostridium botulinum type A.

Ataee RA,(PhD); Ghorbanei G,(MD); Behzadian Nejad Q,(PhD); Satari M,(PhD); Riazi GH,(PhD).

The principal hazard of clostridia in human is production of the most lethal toxin. In order to prevent food poisoning and botulism infection, developing new methods to control bacterial growth, toxin production and its activation is essential. Recently, the botulinum toxin type A has been considered in treatment of different disease and many efforts have been carried out to find out its production and stability mechanisms.

In this investigation, the effects of magnesium sulfate, and incubation time on germination of spore, growth and toxin poduction by Clostridium botulinum type A were studied. Samples with different concentrations of magnesium sulfate were inoculated with 10^6 cfu/ml spores, or with 10^7 cfu/ml bacterial suspension, anaerobically incubated at 35°C, analysed for spore germination, growth and toxin production.

The results indicated that, magnesium sulfate at the level of 6 mg/ml increases the rate of Clostridium botulinum type A spore germination about 40 precent and at 8 mg/ml, increases the growth, protein production, and neurotoxicity of the bacteria 4, 2 and 100 times, respectively.

The results of this study show that, enzymes affect spore germination and metabolism can be induced activity by magnesium ions. Therefore, the rate of spore germination and total protein production is increased. It may be possible that, magnesium ions have been chelated with toxin and alert its configuration, then the neurotoxicity increased.

magnezium sulfate, Clostridium botulinum type A, toxin.

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)

۲– استادیار بخش عفونی، مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)

۳ – دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- استادیار گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A با تولید یکی از مهلک‌ترین سموم همواره خطر بالقوه ای برای انسان محسوب می‌گردد. دست‌یابی به روش‌های کنترل رشد باکتری، تولید توکسین و یا غیرفعال کردن آن، نگرانی از آلودگی مواد غذایی و بروز بوتولیسم را از بین می‌برد. افزون براین، کاربردهای درمانی توکسین بوتولینوم باعث توجه بیش از پیش به این سم شده است.

در این تحقیق اثر سولفات منیزیم بر تندش اسپور، رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A بررسی گردید. محیط کشت مناسب انتخاب و پس از تهیه رقت‌های مختلف سولفات منیزیم در آن، با سوسپانسیون اسپور حاوی 10^6 عدد در هر میلی‌لیتر، یا سوسپانسیون باکتری حاوی 10^7 عدد در هر میلی‌لیتر تلقیح گردید. و در شرایط بی‌هوازی و دمای 35^oC گرمخانه گذاری شدند. پس از زمان‌های مختلف گرمخانه گذاری، محیط‌ها از نظر تندش اسپور، رشد و تولید توکسین مورد بررسی قرارگرفتند.

نتایج نشان داد که ٦ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم باعث افزایش تندش اسپور به دو برابر، و ٨ میلی‌گرم آن نیز باعث افزایش رشد باکتری به میزان ٤ برابر، و افزایش پروتئین به میزان ۲ برابر و افزایش نوروتوکسیسیتی به میزان ۱۰۰ برابر می‌گردد.

بنابراین نتایج مؤید آن است که یون منیزیم نقش القا کننده‌ای برای فعالیت آنزیم های ژرمیناسیون و نیز آنزیم‌های دخیل در متابولیسم دارد، لذا افزایش سرعت تندش اسپور، افزایش رشد و تولید پروتئین را به همراه دارد که احتمالاً با اتصال به مولکول سم و تغییر ساختار آن باعث افزایش سمیت آن می‌گردد.

گل‌واژگان: *سولفات منیزیوم، کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ، توکسین.*

مقدمه:

کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A یکی از عوامل ۷ گانه بیماری مهلک بوتولیسم است، که انتشار جهانی دارد. خوردن غذای آلوده به توکسین یا اسپور این باکتری موجب بیماری می‌گردد(۳-۱). لذا نگرانی دائمی از آلودگی مواد غذایی و ایجاد بوتولیسم وجود دارد. همچنین، با آنکه ژن تولیدکننده توکسین تیپA کلستریدیوم بوتولینوم کروموزومال است(۴)، در باکتری‌های دیگر انتشار یافته و در نتیجه ایجاد بوتولیسم با باکتری‌هایی غیر از کلستریدیوم بوتولینوم بر نگرانی‌های موجود افزوده است. به علاوه ظهور باکتری‌های سایکروتروفیک که پروتئین‌های شبه نوروتوکسین بوتولینوم تولید می‌کنند وباعث بیماری‌های روانی می‌گردند، روبه افزایش است(۵). اما بدلیل کاربرد درمانی توکسین تیپ A بوتولینوم بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است(۶).

افزون براین، غیر فعال شدن سریع نوروتوکسین تیپ A بوتولینوم، کاربردهای پزشکی آن را با مشکل مواجه کرده‌است(۷). بنابراین، دست‌یابی به عوامل فیزیکوشیمیایی که باعث امنیت مواد غذایی بشود، نگرانی بروز بوتولیسم را ازبین می برد(۸) و در صورتی که مکانیسمی برای افزایش کیفیت توکسین و نیز پایداری آن ایجاد گردد. کاربرد آن را در پزشکی تسهیل کرده و مشکلات موجود را کاهش می‌دهد(۹و۱۰).

اثر متقابل فلزات و میکروارگانیسم‌ها بر هم از پدیده‌هایی است که روزبه روز بر اهمیت آن افزوده می‌شود. لذا، تحقیق درخصوص اثر یون‌ها در ساختار اتصالی پروتئین‌ها، نحوه انتقال و نقش مدولاتوری آنها منجر به ظهور رشته‌ای بنام بیوهیدرومتالورژی[1] شده است(۱۱).

در هر حال، با توجه به این که دست‌یابی به عامل فیزیکی یا شیمیایی که بتواند باعث مهار رشد و تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم گردد یا برعکس موجب افزایش رشد و تولید توکسین یا پایداری بیشتر آن شود، بسیار حایز اهمیت است. زیرا در مورد اول، جلوگیری از بیماری بوتولیسم امکان پذیر می‌شود و در مورد دوم باعث بهبود در تولید و نگهداری توکسین می‌گردد. از این رو هدف این تحقیق، بررسی اثر سولفات منیزیوم بر تندش(رویش) اسپور، رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A است.

روش‌کار:

مواد :

در این تحقیق موش سفید آزمایشگاهی به وزن ۱۸ تا ۲۲ گرم (۱۲) از انستیتو پاستورایران، کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A و پادتن اختصاصی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم از Tarasoich

[1]- Biohydrometallurgy

www.SID.ir

Archive of SID

Musco، محیط کشت تریپتیکیزسوی‌براث، سیستئین هیدروکلراید، گلوکزمنوهیدرات، عصاره‌مخمر، هیدروکسیدسدیم، اسیدکلریدریک، سولفات منیزیم($MgSo_4,7H_2o$)، جار و گاز پک از Merck آلمان و فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵میکرومتری از سارتریوس تهیه گردید. روش‌های آماری از قبیل آزمون‌های آنالیز واریانس و t-test با استفاده از نرم افزار STATA انجام شد.

تهیه محلول ذخیره سولفات منیزیم

برای ساخت محلول ذخیره سولفات منیزیم، از پودر سفید رنگ $MgSo_4,7H_2o$ با وزن ملکولی ۲۴۶/۴۸ گرم، پس از کسر وزن آب موجود در آن، مقادیر ۲۰/۵، ۴۱، ۶۱/۵، ۸۲ و ۱۰۲/۵ گرم پودر سولفات منیزیم بدون آب را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و محلول‌هایی با غلظت ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ گرم در میلی‌لیتر یا ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و در شیشه رنگی در یخچال نگهداری شد.

اثر سولفات منیزیم بر تندش اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A

برای این منظور، ۱۲سری ۱۸تایی لوله آزمایش انتخاب و به هر یک، ۹ میلی‌لیتر محیط تولید توکسین(تریپتیکیز سوی براث، ویتامین K ۰/۲ml/lit، عصاره مخمر 5g/li، گلوکز5g/lit و سیستئین هیدروکلراید 1g/lit) افزوده شد. سپس با اضافه کردن مقدار مناسب محلول سولفات منیزیم، غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ساخته شد. در هر مورد یک لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت و بدون سولفات منیزیم به عنوان کنترل درنظر گرفته شد. این عمل بدین‌ترتیب انجام گرفت که ابتدا، محیط کشت تولید توکسین با pH=۶/۹ ±۰/۱ تهیه گردید. سپس، به هر یک از سرهای ۱۲ سری ۱۸ تایی لوله‌های آزمایش۹ میلی‌لیتر محیط کشت تولید توکسین ریخته شد. با افزودن مقدار معینی از غلظت های ذخیره سولفات منیزیم، حجم هر یک از سری‌های ۱۸گانه به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بدین ترتیب غلظت‌های مورد نظر حاصل گردید. پس از آن، لوله های محتوی محیط کشت حاوی غلظت‌های سولفات منیزیم گفته شده در بالا، در ۱۲۱° C به مدت ۱۵ دقیقه سترون(استریل) شدند. با قرار دادن محیط‌های سترون شده در گرمخانه ۳۵° C به مدت ۲۴ ساعت، کنترل آلودگی بعمل آمد. سپس هر یک از سری‌های ۱۸گانه و نیز گروه کنترل فاقد سولفات منیزیم، با سوسپانسیون اسپور با تعداد مشخص تلقیح گردید.

تلقیح، گرمخانه گذاری و تعیین روند تندش اسپور

هر یک از سری‌های ۱۸گانه غلظت های مختلف سولفات منیزیم و نیز لوله‌های کنترل فاقد این‌ماده با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور، شامل 10^8 عدد اسپور افزوده شد و غلظت نهایی 10^6 عدد در میلی‌لیتر حاصل گردید. سپس، هر یک از سری‌های ۱۸ گانه به همراه کنترل بطور جداگانه درشرایط بیهوازی(جار و گاز پک) گرمخانه گذاری شدند. و در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲ و ۲۴ ساعت، سری مربوطه، از گرمخانه خارج و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۸۵°C قرار داده شد. پس از حرارت دادن به محیط‌ها، از هر یک ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط تریپتیکیز سوی حاوی ۵درصد آگار منتقل گردید(از هر غلظت ۳ نمونه برداشته و روی۳ پلیت انتقال داده شد). و با اپلیکاتور شیشه‌ای استریل بخوبی در سطح پلیت پخش گردید. و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بیهوازی گرمخانه گذاری شدند. پس از آن، با شمارش تعداد پرگنه‌های رشد کرده، اثر غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم بر تندش اسپور تعیین گردید.

اثر سولفات منیزیم بر رشد و تولید توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم

برای این منظور، چهار سری ۲۴ تایی لوله آزمایش انتخاب و به هر یک ۹ میلی‌لیتر محیط تولید توکسین افزوده شد. سپس با اضافه نمودن مقدارمناسب محلول سولفات منیزیم، غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ساخته شد. در هرمورد یک لوله حاوی۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت و بدون سولفات منیزیم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. این عمل بدین ترتیب انجام گرفت که ابتدا، محیط کشت تولید توکسین با pH=۶/۹±۰/۱ تهیه گردید. سپس، به هر یک از سرهای ۲۴ تایی لوله‌های آزمایش۹ میلی‌لیتر محیط کشت تولید توکسین ریخته‌شد. با افزودن مقدار معینی از غلظت‌های ذخیره سولفات منیزیم، حجم هریک از سری‌های ۲۴گانه به۱۰میلی‌لیتر رسانده شد. بدین‌ترتیب غلظت‌های مورد نظر حاصل گردید. پس از آن، لوله‌های محتوی محیط کشت حاوی غلظت‌های سولفات منیزیم ذکر شده در بالا، در ۱۲۱° C به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند و از آنها کنترل آلودگی بعمل‌آمد. سپس هر یک از غلظت‌های ۲۴ گانه به همراه کنترل(لوله فاقد سولفات منیزیم)، با کشت ۱۸ساعته(periculture) با تعداد مشخص تلقیح گردید.

اندازه‌گیری رشد با شمارش تعداد پرگنه‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری رشد با شمارش تعداد پرگنه‌ها[1] انجام شد. برای این منظور هریک ازشیشه های کشت در زمان تعیین شده، از گرمخانه خارج و از آن رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7} تهیه گردید. از هر رقت ،۳ نمونه ۱۰۰ میکرولیتری روی ۳ پلیت حاوی تریپتیکیز سوی که دارای ۵ درصد آگار بود، انتقال داده و با میله(اپلیکاتور) شیشه‌ای استریل بخوبی در سطح پلیت پخش گردید و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷° C گرمخانه گذاری شدند. با شمارش تعداد پرگنه‌های رشد کرده درهر سه پلیت، میانگین آنها تعیین شد، سپس با وارد کردن ضریب رقت در هر مورد میزان رشد، در زمان‌های مشخص، محاسبه گردید(۱۳).

تعیین روند رشد با اندازه گیری جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر

علاوه بر تعیین میزان رشد با شمارش پرگنه‌ها، از هر یک از شیشه‌های کشت که به مدت مشخصی گرمخانه گذاری شده بودند، کدورت سنجی انجام شد. بدین ترتیب که ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت را در لوله مخصوص(کوت) اسپکتروفتومتر ریخته و ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و در محدوده طول موج‌های ۲۰۰ – ۶۰۰ نانومتر اسکن انجام شد و مشخص گردید، بیشترین میزان جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر حاصل می‌شود. از این رو، میزان جذب همه محیط‌های مورد نظر در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری مقدار پروتئین کل

هر یک از شیشه‌ها که در زمان تعیین شده گرمخانه گذاری شده بودند، ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و سانتریفوژ گردید(۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴°C)، مایع رویی با فیلتر µm ۰/۴۵ استریل شد. سپس با استفاده از روش‌براد فورد[2] غلظت کل‌پروتئین (پروتئین توتال) اندازه‌گیری شد(۱۴).

تلقیح، گرمخانه گذاری و تعیین تولید توکسین

هریک از سری‌های ۴ گانه حاوی غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم و نیز لوله‌های کنترل فاقد این ماده با ۰/۲ میلی‌لیتر کشت ۱۸ ساعته، شامل 10^{7} عدد باکتری تلقیح گردید. پس از آن، هر یک از سری‌ها و نیز کنترل بطور جداگانه در شرایط بیهوازی(جار و گاز پک) و دمای°C ۳۵ گرمخانه گذاری شدند. و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، سری مربوطه، از گرمخانه خارج و از نظر میزان رشد، تولید توکسین و نوروتوکسیسیتی بررسی گردید.

نوروتوکسیسیتی

برای تعیین نوروتوکسیسیتی هر یک از کشت‌ها، پس از گرمخانه گذاری، ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره استریل شده محیط کشت را به صورت داخل صفاقی در موش‌های۱۸-۲۲ گرمی تزریق گردید. و حداکثر تا ۴۸ ساعت حیوان تحت مراقبت بود. این آزمون همیشه با کنترل منفی(۰/۵ml از محلول حاوی ۱ml عصاره استریل شده و ۱ml آنتی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم) و نیز کنترل محیط کشت و کنترل بافر همراه بود(۱۵).

یافته ها:

نتایج اثر غلظت‌های سولفات منیزیم بر تندش اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A

اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A در حالت عادی در محیط تریپتیکیز سوی براث، پس از ۶ ساعت گرمخانه گذاری در° C ۳۵ شروع به رویش کرد. پس از ۱۲ ساعت ۲۵ تا ۳۰ درصد و پس از ۲۴ ساعت حدود ۷۰ تا ۷۵ درصد اسپورها به فرم رویشی تبدیل شدند و کل اسپورها درمدت ۲۷ ساعت به حالت رویشی تبدیل شدند (نمودار ۱).

نمودار ۱: اثر غلظت‌های سولفات منیزیم بر رویش اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ نشان داده شده است، غلظت‌های سولفات منیزیم باعث افزایش سرعت رویش اسپورمی‌گردند. بطوری که غلظت‌های بیش از ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیترافزایش‌دهنده‌سرعت رویش اسپوراست(P < ۰/۰۳).

[1]-Colony count

[1]-Bradford method

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج شمارش اسپور میانگین ۳ تکرار و بر اساس لگاریتم بر مبنای ۱۰ نوشته شده است.

در هر حال، نتایج مؤید آن است که وجود غلظت‌هایی از سولفات منیزیم در محیط، باعث افزایش سرعت رویش اسپور می‌گردد. چنانکه ۲ تا ۵ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر سولفات منیزیم باعث می‌شود، پس از ۲ ساعت گرمخانه گذاری اسپورها شروع به رویش نمایند. پس از ۶ ساعت حدود ۱۵ درصد و پس از ۱۲ ساعت تقریباً ۷۰ درصد و بعد از۲۴ ساعت بیش از ۹۵ درصد اسپورها تبدیل به فرم رویشی می‌گردند($P <$ ۰/۰۳). همچنین،۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم باعث می‌گردد. پس از ۱۲ ساعت حدود ۹۰ درصد و بعد از ۱۸ ساعت تقریباً ۹۸ درصد اسپورها به فرم رویشی تبدیل شود($P <$ ۰/۰۱)، همان طور که درنمودار ۱ نشان داده شده است. غلظت ۲ تا حداکثر ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم در محیط کشت باعث افزایش سرعت رویش اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A می‌گردد و غلظت های بیش از ۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تأثیر چندانی بر سرعت رویش اسپورها ندارد.

نتایج اثر غلظت های سولفات منیزیم بر رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A

اثر غلظت های سولفات منیزیم بر رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A در زمان‌های مختلف گرمخانه گذاری در نمودار ۲ نشان داده شده است. غلظت‌های سولفات منیزیم پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری باعث افزایش رشد(بر اساس اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر) کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A می‌گردد، حداکثر میزان رشد، بعد از۹۶ ساعت گرمخانه گذاری در محدوده غلظتی ۸-۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دیده می‌شود ($P <$ ۰/۰۴). افزایش غلظت باعث زیادشدن رشد نگردید(نمودار ۲). بعلاوه، با آن که گرمخانه گذاری تا ۹۶ ساعت افزایش رشد را در پی دارد اما ادامه گرمخانه گذاری بعد از ۹۶ ساعت باعث کاهش میزان جذب گردید.

نمودار۲: اثر غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم بر رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ ، چنانچه نشان داده شده‌است، غلظت۸-۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیریم باعث افزایش رشد باکتری شده است($<$ ۰/۰۴).

نتایج اثر غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم برتولید پروتئین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A

همانطورکه در نمودار۳ دیده می‌شود، در شاهد(محیط فاقد سولفات منیزیم) بعد از۴۸ ساعت گرمخانه گذاری،۱۱ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین ایجاد شده است و افزایش غلظت سولفات منیزیم تا۱۰ میلی گرم در میلی‌لیتر، افزایش جزیی پروتئین را به همراه دارد. ولی غلظت بیش از ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیترسولفات منیزیم، باعث افزایش مقدار پروتئین نشده است. پس از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری غلظت پروتئین در محیط شاهد به ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید. درصورتیکه در محیط حاوی ۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم غلظت پروتئین به حدود ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش یافت. بعد از۹۶ ساعت گرمخانه گذاری غلظت پروتئین درشاهد به ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و در محیط حاوی ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم، غلظت پروتئین به ۵۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید. در محیط حاوی۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم غلظت پروتئین به ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش یافت. بیش از۲۰ میلی گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم با افزایش غلظت پروتئین همراه نبود. همچنین، گرمخانه گذاری۱۲۰ ساعته نه تنها باعث افزایش غلظت پروتئین نشد، بلکه هم در محیط شاهد و هم در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم، غلظت پروتئین کاهش نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

نمودار۳: اثر غلظت‌های سولفات منیزیم بر تولید پروتئین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ در زمان‌های مختلف، چنانچه نشان داده شده است، گرمخانه گذاری ۹۶ ساعته محیط کشت حاوی غلظت۲۰-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم باعث افزایش تولید پروتئین می‌گردد(۰/۰۲>). ولی غلظت بیش از ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم باعث افزایش غلظت پروتئین نیست.

مقایسه اثرغلظت‌های مختلف سولفات منیزیم بر رشد، تولید پروتئین و نوروتوکسیسیتی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A

چنانکه در جدول۱ مشاهده می‌شود، اثر غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم بر رشد(با اندازه‌گیری جذب و نیز با شمارش پرگنه‌ها)، تولید پروتئین و نوروتوکسیسیتی کشت ۹۶ ساعته کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ارایه شده است. همانطوری که ملاحظه می‌گردد، ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم باعث افزایش رشد به میزان ۲ برابر می‌شود. درحالی که ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بر تولید پروتئین کل می‌افزاید. سمیت(MLD_{100}) عصاره استخراج شده از این محیط برای هر میلی‌گرم پروتئین معادل ۱×۱۰^{۵} موش ۱۸-۲۲ گرمی است. در واقع، ۱۰ برابر بر نوروتوکسیسیتی در مقایسه با شاهد افزوده شده است. ۱۰ میلی‌گرم سولفات منیزیم باعث افزایش رشد به میزان ۴ برابر و افزایش غلظت پروتئین به میزان ۲ برابر شده است. در حالی که در مقایسه با شاهد، نوروتوکسیسیتی ۱۰۰ برابر افزایش نشان می‌دهد(نمودار ۴). با آنکه، ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم در محیط حدود ۶ برابر افزایش رشد و ۳ برابر افزایش پروتئین را به دنبال دارد اما در نوروتوکسیسیته تغییری ایجاد نکرد. همچنین افزایش‌غلظت سولفات منیزیم تا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در میزان رشد و تولید پروتئین کل تغییر معنی‌داری ایجاد نشد، اما در نوروتوکسیسیته ۱۰ برابر کاهش ایجاد گردید. غلظت بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم نه تنها کاهش رشد و تولید پروتئین را در بر دارد بلکه باعث کاهش سمیت عصاره استخراج شده از محیط کشت گردید. غلظت بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم سولفات منیزیم در محیط رشد کلستریدیم بوتولینوم باعث کاهش رشد،کاهش پروتئین کل و نوروتوکسیسیتی شد. رابطه بین رشد و نوروتوکسیسیتی درمحیط حاوی غلظت‌های سولفات منیزیم در نمودار ۴ نشان داده شده است.

www.SID.ir

جدول ۱- اثر غلظتهای سولفات منیزیم بر رشد، تولید پروتئین و فعالیت توکسین تیپ کلستریدیوم بوتولینوم در کشت ۹۶ ساعته نشان داده شده است.

Archive of SID

غلظت سولفات منیزیم بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر	میانگین جذب	تعداد پرگنه شمارش شده در هر غلظت	غلظت پروتئین بر حسب میکروگرم در میلی لیتر	فعالیت توکسین بر حسب غلظت ۱۰۰٪ کشنده
۰ (شاهد)	۰/۱۲۲ ±۰/۰۰۳	۱ / ۳ × ۱۰ ^{۸}	۲۷ ± ٤	۱× ۱۰ ^{٤}
۰/۲	۰/۱۲٥±۰/۰۰٤	۱ / ۳ × ۱۰ ^{۸}	۲۷ ± ٤	۱× ۱۰ ^{٤}
۰/٤	۰/۱۳۰±۰/۰۰٤	۱ / ٤ × ۱۰ ^{۸}	۳۰ ± ٤	۱× ۱۰ ^{٤}
۰/٦	۰/۱۳۷±۰/۰۰۷	۱/٤ × ۱۰ ^{۸}	۳۰ ± ٤	۱× ۱۰ ^{٤}
۰/۸	۰/۱٤۰±۰/۰۰۸	۱ / ٥ × ۱۰ ^{۸}	۳۰ ± ٤	۱× ۱۰ ^{٥}
۱	۰/۱٤۱±۰/۰۰۸	۱/٥ × ۱۰ ^{۸}	۳۰ ± ٤	۱× ۱۰ ^{٥}
۲	۰/۲۳۳±۰/۰۰۹	۲/٥ × ۱۰ ^{۸}	۳۲ ± ٤	۱× ۱۰ ^{٥}
٤	۰/۲٤۳±۰/۰۳	۲/٥ × ۱۰ ^{۸}	۳۳ ± ٤	۱× ۱۰ ^{٥}
٦	۰/۲۹۷±۰/۰٤	۲/٥ × ۱۰ ^{۸}	٤۹ ± ٦	۱× ۱۰ ^{٥}
۸	۰/۳۲۰±۰/۰٦	۳/٥ × ۱۰ ^{۸}	٥٦ ± ٦	۱× ۱۰ ^{٦}
۱۰	۰/۳۷۷±۰/۰۷	٥/٥ × ۱۰ ^{۸}	٥٥ ± ٦	۱× ۱۰ ^{٦}
۱۲	۰/۳۹۰±۰/۰۸	۷/٥ × ۱۰ ^{۸}	٥۸ ± ٦	۱× ۱۰ ^{٦}
۱٤	۰/٤۰۸±۰/۰۹	۷/۹ × ۱۰ ^{۸}	۷٤ ± ۸	۱× ۱۰ ^{٦}
۱٦	۰/٤٤۱±۰/۰۹	۹ × ۱۰ ^{۸}	۷۸ ± ۷	۱× ۱۰ ^{٦}
۱۸	۰/٤٥۰±۰/۱	۹ × ۱۰ ^{۸}	۷٦± ۹	۱× ۱۰ ^{٦}
۲۰	۰/٤٥۷±۰/۱۲۲	۹/۲ × ۱۰ ^{۸}	۷۸ ± ۹	۱× ۱۰ ^{٦}
۳۰	۰/٤٦۷±۰/۱۳	۹/۳ × ۱۰ ^{۸}	۷۹ ± ۸	۱× ۱۰ ^{٥}
٤۰	۰/٤٦۹±۰/۱۳	۸/٥ × ۱۰ ^{۸}	۷۷ ± ۷	۱× ۱۰ ^{٥}
٥۰	۰/٤٥۰±۰/۱۳	۷ × ۱۰ ^{۸}	۷٥ ± ۷	۱× ۱۰ ^{٥}
٦۰	۰/٤٤٦±۰/۱۳	٦/٥ × ۱۰ ^{۸}	٥۸± ۷	۱× ۱۰ ^{٤}
۷۰	۰/٤۹٤±۰/۱۲	٦/٥ × ۱۰ ^{۸}	٦۰± ۷	۱× ۱۰ ^{٤}
۸۰	۰/٤٦٤±۰/۱۲	٦ × ۱۰ ^{۸}	٥٦ ± ۷	۱× ۱۰ ^{٤}
۹۰	۰/٤۰٥±۰/۱۱	٦ × ۱۰ ^{۸}	٥٤ ± ۷	۱× ۱۰ ^{٤}
۱۰۰	۰/٤۰۳±۰/۱	٦ × ۱۰ ^{۸}	٥۲ ± ۷	۱× ۱۰ ^{٤}

جلوگیری از رشد و تولید توکسین، مواد غذایی را از بوتولیسم محفوظ دارند. تعداد زیادی از پژوهشگران نیز برای تولید بیشتر توکسین، و نیز افزایش کیفیت درمانی آن درتلاش هستند. لذا، از عوامل مختلف شیمیایی و فیزیکی استفاده کرده‌اند.

در این تحقیق اثر سولفات منیزیم بر رویش اسپور، رشد باکتری و تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A بررسی گردید. برای انجام این عمل، ابتدا شرایط مطلوب برای رشد و تولید توکسین در شرایط نبود این یون در محیط کشت باکتری بررسی شد، سپس روند رشد و تولید توکسین تعیین گردید.

اثر سولفات منیزیم بر تندش(رویش) اسپور نشان داد ۶mg/ml از این ماده، پس از۱۸ ساعت سبب رویش۹۸ درصد اسپورها می‌شود، درحالی که در محیط کنترل این مقدار به ۴۰ درصد می‌رسد. پس از ۲۴ ساعت اثر ۶ mg/ml سولفات منیزیم باعث رویش کل اسپورها شده است درحالیکه درگروه کنترل فقط ۷۰درصد اسپورها به فرم رویشی تبدیل‌شده‌اند. همچنین، ۱۲mg/ml سولفات منیزیم، پس از ۱۸ ساعت باعث رویش کل اسپورها در محیط می‌گردد. در حالی که در محیط کنترل پس از ۲۴ ساعت حدود ۷۰ درصد اسپورها رویش یافته‌اند و برای این که کل اسپورها رویش یابند، به حدود ۳۰ ساعت زمان نیاز است. لذا به نظر می‌رسد،

نمودار ۴- اثر غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم بر رشد و نوروتوکسیسیتی کشت ۹۶ ساعته کلستریدیوم بوتولینوم تیپ

بحث:

توکسین‌های کلستریدیوم بوتولینوم عامل بیماری مهلک بوتولیسم در انسان شناخته شده‌اند(۱). اما بدلیل کاربرد درمانی توکسین تیپ A بوتولینوم بیش از پیش مورد توجه پژوهشگران قرارگرفته است(۶). برخی از دانشمندان در تلاش هستند، با

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های mg/ml ۱۲-۶ سولفات منیزیم باعث افزایش سرعت رویش اسپور گردد(نمودار ۱).

تحقیقات متعددی در باره شرایط مؤثر بر تندش اسپور کلستریدیوم بوتولیوم تیپ A، رشد و تولید توکسین انجام گرفته است. در سال ۱۹۷۰ رالی و فهری شرایط مؤثر برتندش (رویش)[1] اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A سویه ۶۲ را بررسی کردند. نتیجه تحقیقات آنها نشان داد که حرارت C °۸۰ به مدت ۶۰ دقیقه سرعت تبدیل اسپور را به فرم رویشی افزایش می‌دهد، درحالیکه اشعه گاما بر این عمل تأثیری ندارد(۱۶).

در سال ۱۹۸۳ بریوزو و همکاران نشان‌دادند، کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A درشرایطی که فعالیت آبی[2] برابر ۰/۹۷۲- ۰/۹۶۵ و pH=۵/۷ باشد، رشد نموده و توکسین تولید می‌کند. درحالیکه در شرایط کمتر ازحالت‌های فوق باکتری رشد نموده اما توکسین تولید نمی‌کند(۱۷). درسال ۱۹۸۹ کارن دادس اثر توأم فعالیت آبی و pH را درمهار تولید توکسین بررسی و نشان‌داد غذاهای بسته‌بندی دارای فعالیت آبی ۰/۹۷۰- ۰/۹۵۵ و ۵/۷۵ - pH=۴/۷۵ را میتوان با اطمینان تا ۲ ماه در شرایط معمولی نگهداری کرد، بدون آنکه توکسین در آنها تولید شود(۱۸). در ۱۹۹۲ میلان و همکاران اثر عوامل مختلف از جمله مواد غذایی، یون‌های فلزی، درجه حرارت، شرایط بیهوازی و pH را بر رشد و تولید توکسین بررسی کرده و اذعان داشتند، بهترین شرایط برای رشد و تولید توکسین، محیط حاوی ۳ درصد پپتون، ۰/۵درصد تریپتون، ۱/۱درصد گلوکز و ۰/۵درصد عصاره مخمر، با pH=۸ و ۱۲ روز گرمخانه گذاری درC °۲۶ است(۱۹). در سال ۱۹۹۸ شافنر و همکاران اثر توأم درجه حرارت، pH، کربوهیدرات، پروتئین و چربی را بررسی کرده و مدت زمان لازم برای رشد باکتری و نیز تولید توکسین را تعیین کردند(۲۰). در سال ۱۹۹۹ گلاس و همکاران اثر pH و دی‌اکسیدکربن را بر رشد و تولید توکسین در بسته‌های شیرینی و دافاس و همکاران اثر دی‌اکسیدکربن در شیر پاستوریزه را بررسی‌کردند. آنها نشان دادند، دی‌اکسیدکربن باعث تقویت رشد و تولید توکسین می‌گردد(۲۱و۲۲).

درخصوص اهمیت نقش یون‌های فلزی در پدیده‌های بیولوژی، تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است(۲۳)، اما اکثر گزارش‌ها درخصوص باکتری‌های هوازی است. در حالی که گزارشی درخصوص بررسی اثر یون‌های فلزی بر اسپور کلستریدیوم بوتولینوم که بی‌هوازی مطلق است وجود ندارد. افزون بر این، با آن که توجه زیادی به کنترل‌های میکروبی مواد غذایی به ویژه فرآورده‌های گوشتی در جریان است. با این حال، اشاره‌ای به نابودی اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم در محصولات غذایی نشده است(۲۴). همچنین برای جلوگیری از بوتولیسم و نیز فساد فرآورده‌های گوشتی ناشی از انواع کلستریدیوم(۲۵). نقش اسپورها نادیده گرفته شده است. و هیچ بحثی از اثر یون‌ها بر اسپور کلستریدیوم بوتولینوم به میان نیامده است.

در هر حال، بررسی اثر سولفات منیزیم بر رشد، تولید پروتئین و نیز نوروتوکسیسیتی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A نشان داد، غلظت ۸ تا ۱۲ میلی گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم تا ۹۶ ساعت گرمخانه گذاری موجب افزایش رشد، افزایش تولید پروتئین و نیز افزایش نوروتوکسیسیتی کلستریدیوم بوتولینوم گردید (نمودارهای ۲ الی ۴). اندازه گیری رشد، تولید پروتئین و نیز توکسیسیتی کشت ۹۶ ساعته نشان داد. ۶ تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم باعث ۴ برابر افزایش‌رشد، ۲ برابر افزایش پروتئین و ۱۰۰ برابر افزایش نوروتوکسیسیتی گردید. اضافه بر آن، افزایش غلظت سولفات منیزیم (۱۰-۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) باعث افزایش رشد به میزان ۷ برابر و نیز افزایش پروتئین به میزان ۳ برابرگردید(جدول ۱) اما در نوروتوکسیسیتی تغییری مشاهده نشد. این نتایج بر خلاف یافته‌های تامپکین و همکارانش است که نشان دادند استفاده از ۱درصد سوربات پتاسیم موجب تأخیر در رشد و تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم می‌گردد(۲۶). همچنین بوون و همکاران اثر آسکوربات سدیم و نیتریت سدیم را بر تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم بررسی کردند. آنها نشان دادند، وجود آسکوربات سدیم در محیط مانع تولید توکسین نمی‌گردد(۲۷). در سال ۱۹۷۵ هوتانن و واسرمن با افزودن نیتریت آهن به محیط کشت مانع رشد و تولید توکسین توسط این باکتری شدند(۲۸). با وجود آن که، افزودن نمک سولفات منیزیم به برخی محیط‌های کشت به عنوان عامل رشد رایج است اما به نظر می‌رسد، مقدار توصیه شده ناچیز باشد. زیرا در این تحقیق غلظت‌های کمتر از ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تأثیر چندانی نشان نداد. در حالی که افزودن بیش از ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم به محیط باعث افزایش رشد، افزایش تولید پروتئین و نیز افزایش نوروتوکسیسیتی گردید. اما بیش از۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات منیزیم در محیط اثر مهاری بر رشد و تولید پروتئین و نیز نوروتوکسیسیتی نشان داد.

روند رشد، تولید پروتئین و نیز تولید توکسین نشان داد بین رشد لگاریتمی و تولید پروتئین کل همبستگی زیادی($P<۰/۰۰۲$) وجود

[1] - Germination
[2] - Water activity

www.SID.ir

Archive of SID

دارد (جدول ۱). با آن که پروتئین‌های تولید شده قبل از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و قبل از رسیدن به مرحله سکون رشد فاقد اثرات نوروتوکسینی هستند، و ماهیت آنها برای ما ناشناخته است، با این حال، نقش متابولیسمی آنها در روند رشد، قابل انکار نیست. احتمالاً اکثر آنها آنزیم های پروتئولیتیک هستند که برای جذب مولکول‌های غذایی ساخته شده‌اند. در این تحقیق، یافته قابل توجهی که از روند رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A بدست آمد، آن است که تولید توکسین بعد از رشد لگاریتمی و ابتدای مرحله سکون است. با ادامه مرحله سکون، تولید توکسین افزایش می‌یابد. در واقع قبل از این که باکتری وارد مرحله اسپور گذاری شود، تولید توکسین وجود دارد و شروع اسپور گذاری با کاهش عیار توکسین همراه است. کاهش نوروتوکسیسیتی احتمالاً حاکی از وجود فعالیت پروتئازها و غیرفعال شدن توکسین باشد. بنابراین، پس از ۱۲۰ ساعت گرمخانه گذاری منحنی تغییرات رشد روند کاهشی نشان‌می‌دهد. زیرا سلول‌های رویشی به اسپور تبدیل شده و اسپور نیز جسمی شفاف بوده و منجر به کاهش کدورت محیط می‌گردد. این امر مؤید آن است که نوروتوکسین در اسپورولاسیون نقش اساسی دارد.

بنابراین، می توان تشکیل اسپور را از دو منظر مورد توجه قرار داد. یکی عوامل تنظیم کننده‌ای که باعث فعال شدن و ابراز ژن‌های اختصاصی اسپورسازی هستند. دوم سیگنال‌هایی که به عوامل تنظیم کننده پاسخ می‌دهند. عقیده بر این است،کاهش کربن و نیتروژن، کاهشGTP را به همراه دارد. درنتیجه باعث فعال شدن مکانیسم‌های اسپورسازی می‌گردد. این امر، با تولید پروتئین‌های القا کننده همراه است. بنابراین به نظر می‌رسد. کاهش GTP(۲۹) و نیز افزایش غلظت توکسین عامل تنظیم کننده مثبت برای اسپورسازی است که پس از شروع اسپورولاسیون و تشکیل پری اسپور از غلظت توکسین کاسته می‌شود. همچنین، بر اساس اطلاعات موجود لیز شدن یعنی متلاشی شدن و بنابراین، وقتی گفته می‌شود، بعد از لیز باکتری توکسین رها می‌شود. یعنی، باید در محیط کشت قطعات خرد شده سلول باکتری دیده شود. در حالی که در این تحقیق چنین حالتی دیده نشد. و بعد از رشد لگاریتمی، تا قبل از تشکیل اسپور ساختار و نیز افزایش غلظت توکسین عامل تنظیم کننده مثبت برای سلولی به صورت دست نخورده باقی ماند. به عبارت دیگر تولید توکسین پس از ۲۴ ساعت شروع و تا ۸۵ ساعت به بالاترین حد خود رسید، بدون این که، اثراتی از لیز سلولی مشاهده شود. بنابراین، به دلیل این که تولید توکسین بعد از رشد لگاریتمی و قبل از تشکیل اسپور در محیط رها می‌گردد. به نظر می‌رسد نقشی در القای اسپورسازی داشته باشد.

نتیجه گیری:

به دلیل مقاومت اسپور به مواد آنتی باکتریال، آلودگی مواد غذایی به اسپور کلستریدیوم بوتولینوم، تهدید دائمی برای سلامت جامعه است. در این تحقیق ۶ میلی‌گرم سولفات منیزیوم باعث تحریک رویش اسپور و تبدیل آن به سلول رویشی گردید. از آنجا که سلول‌های رویشی به مواد ضد میکروبی حساس هستند لذا امکان حفاظت مواد غذایی و جلوگیری از بوتولیسم فراهم شده است. افزون بر این ۸ تا ۱۶ میلی‌گرم سولفات منیزیوم باعث افزایش رشد، تولید توکسین و نوروتوکسیسیتی گردید. از این خاصیت می‌توان برای بهبودی پروسه‌های رشد و تولید توکسین استفاده کرد.

1- Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* Toxins. PharmacTher. 1983; : 165 -94.
2- Carl MJ, Michael GC. Eric JA. Purification of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin. *Methods Mol Biol.* 2000; : 27-39.
3- Byrne PM, Smith TJ, Montgomery VA, et al. Purification, potency, and efficacy of the botulinum neurotoxin type: A binding domain from PICHIA PASTORIS as a recombinant candidate. *Infect Immun.* 1998; (10): 4817-22.
4- Betley JM, Somer E, Dasgupta RB. Characterization of botulinum type A neurotoxin gene delineation of the N- terminal encoding region. *Biochem Biophy Res Communi.* 1989; 162(3): 1388 - 95.
5- Moorhead SM, Bell RG. Psychrotrophic *Clostridium* mediated gas and botulinal toxin production in vacuum- packed chilled meat. *Lett Apple Mirobiol*. 1999; 28 (2): 108- 12.
6- Jankovic J, Brin FM. Therapeutic Uses of botulinum toxin. N Engl J Med. 1991; (17): 1186-94.
7- Brin FM. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity and immunology. *Muscle Nerve Supplement*. 1997; 6: s146 – s170.
8- Skovgaard N. Microbiological aspect and technical need: technological needs for nitrates and nitrites. *Food Additives and Contaminants*. 1992; (5): 391-7.
9- Schantz JE, Johnson AE. Botulinum toxin: the Story of its development for the treatment of human disease . *Perspect Biol Med*. 1997; (3): 317-27.
10- Williamson LC, Halpern JL, Montecucco C, et al. Clostridial Neurotouins and substrate proteolysis in Intact Neurons. *J Biol Chem*. 1996; ! (13): 7694-9.
11- Hughes NM, Poole KR. Metals and Micro- organisms. London: Chapman and Hall; : 1-176.

www.SID.ir

Archive of SID

12- Takahashi M, Komiya T, Kameyama S. Titration of botulinum antitoxin of low levels by the score method. Jpn *J Med Sci Biol*. 1990; : 163-170.
13- Nicolas P. Microbial Growth Kinetics. London: Chapman and Hall. 1995: 378-9.
14- John MW. The Protein Protocols, New Jersey Handbook: human press. 1996: 7-12.
15- Pearce LB, Borodic GE, First ER. Measurement of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay.*Toxicol Appl Pharmacol*. 1994; ": 69-77.
16- Rowley BD, Feeherry F. Condition affecting germination of *Clostridium botulinum* 62A spores in a chemically defined medium. *J Bacteriol.* 1970; (3): 1151-57.
17- Briozzo J, deLagard EA, Chirife J, et al. *Clostridium botulinum* type A growth and toxin production in media and process cheese spread. *Appl Environ Microbiol*. 1983; (3):1150-52.
18- Dodds KL. Combination effect of water activity and pH on inhibition of toxin production by *Clostridium botulinum* in Cooked, vacuum-packed potatoes. *Appl Environ Microbiol*. 1989; (3): 656-60.
19- Calleri CM, Mayorga LS. Centorbi P. Optimization of culture conditions for toxin production of type G *Clostridium botulinum. Zentralbl Bakteriol*. 1992; !!(2): 161- 9.
20- Schaffner DW, Ross HW, Montville JT. Analysis of the influence of environmental parameters on *Clostridium botulinum* time-to-toxicity by using three modeling approaches. *Appl Environ Microbiol*. 1998; (11):4416-22.
21- Daifas DP. Effect of pH and CO_2 on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in English-style crumpets packaged under modified atmospheres .*J Food Prot*. 1999; (10):1157-61.
22- Glass KA, Kaufman KM, Smith AL, et al. Toxin production by *Clostridium botulinum* in pasteurized milk treated with carbon dioxide. *J Food Prot*. 1999; (8):872-6.
23- Reeves WM, Pine L, Hutner H, et al. Metal requirement of *Lgionella pneumophila J Clin Microbiol*. 1981; (4): 688-95.
24- Cammack R, Joannou LC, Cui YX, et al. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochem Bioph Acta.* 1999; : 475-488.
25- Sung N, Klausner AK, Hotchkiss HJ. Influence of nitrate, ascorbic acid, and nitrate reductase microorganisms on N- nitrosamine formation during Korean- style soysauce fermentation. *Food Add Contamin*. 1991; "(3): 291-8.
26- Tompkin BR, Christiansen NL, Shaparis BA, et al. Effect of potassium sorbate on *Salmonellae, Staphylococcus aureus*, *clostridium perfringens, and Clostridium botulinum* in cooked , uncured sausage. *Appl Microbiol.* 1974; "(2) : 262-4.
27- Bowen GV, Cerveny GJ, Deibel HR. Effect of sodium ascorbate and sodium nitrite on toxin formation of *Clostridium botulinum* in wieners. *Appl Microbiol*. 1974; !(3): 605-6.
28- Huhtanen NC, Wasserman EA. Effect of added iron on formation of Clostridial inhibitors. *Appl Mirobiol*. 1975; (5): 768-70.
29- Steloww P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spore of Bacillus species. *Annu Rev Microbiol.* 1995; : 29-54.

www.SID.ir