دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۳، صفحه ۴۸۲- ۴۷۱ (۱۳۹۵)

اثر اسانس کلپوره (*Teucrium polium* L.) بر مهار رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ A جداسازی شده از فراورده‌های لبنی سنتی

محمدوحید صادقی سروستانی[1*]، سعید حسین‌زاده[2]، محسن عصفوری[3]، وحید روشن[4]، معصومه قاسمی‌نژاد[5] و مختار اقتداری[6]

۱*- نویسنده مسئول، مربی آموزشی، مرکز آموزش جهاد کشاورزی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
پست الکترونیک: vahidsadeghi130@yahoo.com

۲- دانشیار، بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

۳- مربی آموزشی، مرکز آموزش جهاد کشاورزی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

۴- استادیار پژوهشی، بخش منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

۵- دانش‌آموخته مهندسی فناوری گیاهان دارویی، مرکز آموزش جهاد کشاورزی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

۶- دانش‌آموخته کارشناسی بهداشت مواد غذایی، مرکز آموزش جهاد کشاورزی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۴

چکیده

کلستریدیوم بوتولینوم یکی از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از مواد غذایی به‌ویژه در غذاهای بسته‌بندی شده در خلأ و فراورده‌های گوشتی بوده و کنترل آن نیز از مهمترین مشکلات کارخانه‌های صنایع غذایی محسوب می‌شود. هدف این مطالعه، بررسی آلودگی فراورده‌های لبنی سنتی به *کلستریدیوم بوتولینوم* و اثر اسانس برگ و گل گیاه کلپوره (*Teucrium polium* L.) در کنترل رشد این باکتری می‌باشد. از ۱۶۰ نمونه کشک و دوغ سنتی به روش کشت فقط یک مورد تیپ A از دوغ جداسازی شد، اما به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (MPCR) یک مورد تیپ A از دوغ (۱/۲۵٪) و از کشک دو مورد تیپ B و یک مورد تیپ A (۳/۷۵٪) شناسایی شد. آنالیز ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس برگ و گل این گیاه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) انجام گردید. ترکیب‌های اصلی تشکیل‌دهنده اسانس گل کلپوره شامل آلفا-پینن (۱۶/۷٪) و والریانول (۸/۳٪) و در اسانس برگ آن شامل آلفا-پینن (۱۴/۸٪)، میرسین (۱۰/۹٪) و جرماکرن D (۱۰/۴٪) بود. برای ارزیابی اثر ضدمیکروبی، ۱۰ میکرولیتر از اسانس برگ و گل کلپوره به‌طور جداگانه به روش دیسک دیفیوژن در سه تکرار مورد سنجش قرار گرفت و قطر هاله عدم رشد باکتری در رقت‌های ۴۰µl/ml و ۸۰ اسانس برگ به‌ترتیب ۹ و ۸ میلی‌متر و اسانس گل ۱۲ و ۸ میلی‌متر بود. غلظت مهاری حداقل (MIC) اسانس گل و برگ کلپوره ۱۶۰µl/ml تعیین شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که می‌توان از اسانس این گیاه برای کنترل رشد *کلستریدیوم بوتولینوم* استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: *کلستریدیوم بوتولینوم*، کلپوره (*Teucrium polium* L.)، اسانس، فراورده‌های لبنی سنتی، MPCR، غلظت مهاری حداقل.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کلستریدیوم بوتولینوم یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، بی‌هوازی اجباری، تشکیل‌دهنده اسپور تحت انتهایی است که نوروتوکسین کشنده‌ای به نام نوروتوکسین بوتولینوم تولید می‌کند (Hasani Tabatabaei & Firozi, 2002). سم این باکتری قوی‌ترین ماده سمّی شناخته شده‌است که مقدار کشندگی آن برای انسان تقریباً ۱ یا ۲ میکروگرم می‌باشد (Solomon & Lilly, 2001). این سم باعث ایجاد فلج عصبی کشنده‌ای به نام بوتولیسم می‌شود. نوروتوکسین بوتولینوم در سیناپس‌های نوروماسکولار باعث عدم آزاد شدن استیل کولین می‌شود که در نتیجه با دوبینی، افتادگی پلک، سختی در بلع، صحبت‌های درهم و نامشخص، خشکی دهان و در نهایت توقف تنفس و مرگ همراه است (Mandell *et al*., 2010).

کلستریدیوم بوتولینوم به‌طور گسترده‌ای در خاک و رسوبات دریاچه‌ها در سراسر جهان پراکنده شده‌است، همچنین در گرد و غبار، غذاهایی که به طور نامناسب فرآوری شده‌اند و حتی هوا وجود دارد. اسپورهای باکتری به خودی خود زیان‌بخش نیستند ولی در عدم حضور اکسیژن، شروع به رشد کرده، در نتیجه سم قوی تولید می‌کنند. توکسین‌های *کلستریدیوم بوتولینوم* براساس خصوصیات آنتی‌ژنیک به ۷ تیپ A تا G تقسیم می‌شوند. تیپ‌های A، B، E و گاهی F بیشتر در انسان و تیپ‌های C و D در حیوانات مسئول بروز بیماری‌اند (Solomon & Lilly, 2001؛ Sanford Malcolm *et al*., 2009). *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ A، B وF مزوفیل بوده، در کمتر از ۱۰ درجه سلسیوس رشد نکرده و رشد بهینه آنها در ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس می‌باشد، بنابراین سرمادوست نیستند و در محصولاتی که به‌طور مناسبی سرد شده‌اند، هیچ‌گونه خطری ایجاد نمی‌کنند. در pH حدود ۴/۳ تا ۴/۵ رشد آنها متوقف می‌شود و غلظت‌های نمک بیشتر از ۱۰٪ را تحمل می‌کنند. اسپور این سوش‌ها به گرما بسیار مقاومند. اثر کشندگی سم A بیشتر از نوع B یا E است (Mortazavi & Sadeghi Mahonak, 2007). نوروتوکسین تیپ A به ۵ تحت تیپ (A1-A5) تقسیم می‌شود. نوروتوکسین A2 قدرت بیشتری دارد. سم بوتولینوم یک متالواندوپپتیداز با وزن مولکولی ۱۵۰ کیلودالتون است که از دو زنجیره پلی‌پپتیدی شامل یک زنجیره سنگین ۱۰۰ کیلودالتونی (۸۴۷ آمینواسید) و یک زنجیره سبک ۵۰ کیلودالتونی (۴۴۸ آمینواسید) که توسط باند دی‌سولفیدی به هم متصل شده‌اند، تشکیل شده‌است (Pier *et al*., 2011). کمپلکس توکسین A به همراه پروتئین‌های محافظت‌کننده وزن مولکولی ۹۰۰ کیلودالتون دارد. در محیط اسیدی معده باند کووالانسی بین توکسین و پروتئین محافظت‌کننده شکسته می‌شود تا سم فعال گردد (Baldwin *et al*., 2004). همه انواع توکسین‌های بوتولینوم بجز توکسین تیپ C_2 پس از ورود به جریان خون به سیناپس‌های نوروماسکولار وارد شده و موجب جلوگیری از آزاد شدن استیل کولین می‌شوند. توکسین پس از جذب براساس دوز ورودی در کمتر از ۳۰ دقیقه در بدن توزیع و پخش می‌شود (Simpson, 2013).

بوتولیسم غذایی در نتیجه خوردن مواد غذایی آلوده به نوروتوکسین بوتولینوم ایجاد می‌شود. در استان‌های شمالی ایران بیش از ۳۰٪ از موارد بوتولیسم غذایی به دنبال مصرف ماهی شور و کنسرو شده، و حدود ۲۰٪ نیز مربوط به استفاده از فرآورده‌های لبنی سنتی (دوغ، پنیر و کشک) ایجاد شده است. در بین سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۶ از میان مواد غذایی مصرف شده، فرآورده‌های دریایی تهیه شده به روش سنتی نظیر ماهی شور و اشپل و فرآورده‌های لبنی سنتی به‌عنوان شایع‌ترین مواد غذایی ایجادکننده بوتولیسم شناخته شده‌اند (Tavakoli *et al*., 2009).

یکی از مشکلات عمده در بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده و تحت خلأ (وکیوم) مواد غذایی، وجود *کلستریدیوم بوتولینوم* و تولید سم توسط این باکتری می‌باشد. البته بوتولیسم غذایی از شخصی به شخص دیگر انتقال نمی‌یابد. فرآورده کنسرو شده خانگی به‌خصوص فرآورده غذایی با اسیدیته پایین، بیشترین موارد بوتولیسم غذایی را موجب شده است (Satterfield *et al*., 2010؛ Rebagliati *et al*., 2009).

در ایران تعداد موارد ثبت شده بوتولیسم در طی سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۵ به‌ترتیب ۴۱، ۶۶، ۴۸ و ۸۰ و میانگین سنی

Archive of SID

www.SID.ir

بیماران ۲۷ سال بوده و تفاوت معنی‌داری بین زن و مرد وجود نداشته است. بیماری بیشتر در استان‌های نیمه شمالی کشور گزارش شده‌است و عمدتاً ماهی شور، اشپل ماهی، پنیر کیسه‌ای و کمپوت خانگی عامل بیماری بوده‌اند و در ۲٪ موارد، غذای کنسرو شده صنعتی عامل ایجاد بیماری بوده‌است. در ایران بیشترین موارد بوتولیسم به‌ترتیب در استان‌های گلستان، تهران، گیلان، خراسان رضوی و همدان اتفاق افتاده است (Tavakoli *et al*., 2009).

در نمونه‌گیری از بیماران و پنیر مصرف شده توسط افراد یک خانواده، با استفاده از آزمایش استاندارد تزریق به موش، آلودگی به توکسین تیپ A *کلستریدیوم بوتولینوم* تشخیص داده شد (Shahcheraghi *et al*., 2013).

نشانه‌های مسمومیت پس از باند شدن نوروتوکسین *کلستریدیوم* منتقل شده از طریق سیستم عروقی به پایانه اعصاب پیش‌سیناپسی کلینرژیک محیطی و توقف آزادسازی نوروترانسمیتر استیل کولین دیده می‌شوند که شامل عوارض گوارشی، اتونامیک و نورولوژیک هستند. شروع علائم، معمولاً فلج شدن ماهیچه‌های اطراف کره چشم به‌دلیل فلج شدن اعصاب سری شماره ۳، ۴ و ۶ می‌باشد که به‌صورت گشادی مردمک، تاری دید، دوبینی و ناتوانی در تطابق دید نزدیک بروز می‌یابد. نشانه‌های افتادگی پلک و اختلال در تکلم به‌صورت برجسته خود را نشان می‌دهند. فلج شدن عصب سری شماره ۷ باعث فلج عضلات صورت و سختی در بلع شده و به‌دلیل فلج شدن عصب سری شماره ۹، بالا آوردن آب یا غذا ممکن است بروز کند (Rebagliati *et al*., 2009؛ Tseng *et al*., 2009).

در صنایع غذایی از انواع عمل‌آوری‌های فیزیکی و شیمیایی برای از بین بردن اسپور و یا کنترل رشد ارگانیسم استفاده می‌شود (Rebagliati *et al*., 2009). استفاده از حرارت (استریلیزاسیون تجاری و پاستوریزه کردن) قادر به از بین بردن سلول‌های رویان، اسپور و توکسین این باکتری در غذا می‌باشد. نیتریت و نمک، معیارهای کنترلی هستند که در استفاده از حرارت برای کنسرو کردن گوشت‌های کم اسید استفاده می‌شوند، همچنین استفاده از یخچال از روش‌های کنترل مهم در نگهداری مواد گوشتی وکیوم شده فاسد شدنی محسوب می‌شود (Razavilar, 2000).

در سال‌های اخیر کاربرد مصرف اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی فرآوری شده به‌عنوان جایگزین مناسبی برای مواد نگهدارنده سنتتیک و افزودنی‌های شیمیایی افزایش یافته است (Noriega *et al*., 2010).

کلپوره یا مریم نخودی (*Teucrium polium*) از تیره نعناعیان است که در زبان عربی به آن مسک‌الجن و حشیشه‌الریح می‌گویند. گیاهیست علفی، پایا و پرشاخه، به ارتفاع ۱۰ تا ۳۵ سانتی‌متر و دارای ظاهر سفید پنبه‌ای که معمولاً در نواحی بایر، سواحل سنگلاخی و ماسه‌زارها می‌روید. برگ‌های آن باریک، دراز و پوشیده از کرک‌های پنبه‌ای در هر دو سطح پهنک است. گل‌هایی به رنگ‌های سفید، سفید مایل به زرد و یا زرد و حتی ارغوانی دارد.

مصرف دارویی آن به زمان بقراط و جالینوس برمی‌گردد و بخش دارویی آن که سرشاخه‌های آن می‌باشد، اثر مقوی و ضدتشنج داشته و مصرف آن را برای رفع بیماری‌های دستگاه تناسلی–ادراری و تأخیر یا عدم وقوع قاعدگی مفید می‌دانند. تحقیقات علمی نشان داده‌اند که این گیاه دارای اثرات ضددیابت، ضدکلسترول و تری‌گلیسرید سرم (Rasekh *et al*., 2001)، ضداشتها، ضدالتهاب (Gharaibeh *et al*., 1988)، آنتی‌اکسیدان، ضدتب و ضدمیکروب و ضددرد (Abdollahi *et al*., 2003) می‌باشد. با وجود این، اثرات این گیاه در ایجاد التهاب کبدی و نارسایی‌های کلیوی نیز اخیراً گزارش شده‌است (Mazokopakis *et al*., 2004).

اسانس کلپوره دارای خاصیت ضداسپاسم قوی بر روی انقباضات ایجاد شده توسط استیل کولین و کلرور پتاسیم می‌باشد. تأثیر این اسانس بر مهار هر دو نوع انقباض مزیت این گیاه را نسبت به آتروپین و هیوسین که تنها بر روی انقباضات ناشی از استیل کولین مؤثر هستند، نشان می‌دهد. در ضمن برای فلاونوئیدهای موجود در فرآورده (لوتئولین ۷–۵ گلیکوزید) نیز اثرات آنتی‌اسپاسمودیک آن گزارش شده‌است (Fayaz, 2013).

Archive of SID
www.SID.ir

عصاره گیاه کلپوره محتوای مواد مؤثره‌ای مانند: دی‌ترپنوئیدها (Di-terpenoid)، ۷-۵-گلیکوزید (5-7-Glycoside)، ۶- متوکسی جنگوانین (6-Methoxy genkwanin) و اسانس فرّار می‌باشد که بیشترین مواد این اسانس جرماکرن B، D (Germacrene B,D)، بتا-کاریوفیلن (β-Caryophyllene)، هومولن (Humulene) و کاریوفیلن اکساید (Caryophyllene oxide) می‌باشد. البته میزان اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی به روش اسانس‌گیری و نوع میکروارگانیسم بستگی دارد (Evrendilek & Balasubramaniam, 2011).

هدف از این مطالعه، جداسازی *کلستریدیوم بوتولینوم* از بعضی از فرآورده‌های سنتی و بررسی اثر خواص ضدباکتریایی اسانس گل و برگ کلپوره بر روی این باکتری و ارائه پیشنهاد استفاده از آن به‌عنوان جایگزین افزودنی‌های شیمیایی در فرایند فرآوری مواد غذایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

۸۰ نمونه از هر یک از فرآورده‌های لبنی سنتی (کشک و دوغ) در بهار تهیه گردید. نمونه‌گیری به روش مبتنی بر هدف از کلیه شهرستان‌های استان فارس تهیه گردید و با رعایت شرایط لازم به آزمایشگاه منتقل شد.

بافر فسفات ژلاتین

برای تهیه فسفات بافر ژلاتینه، ۲ گرم ژلاتین و ۴ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات در یک لیتر آب مقطر ریخته شده و روی حرارت ملایم در آب حل شد. پس از تهیه محلول، pH آن در حد ۶ تنظیم شد (Solomon & Lilly, 2001).

نمونه‌های کشک

تعداد ۸۰ نمونه کشک سنتی که به‌صورت جامد تهیه شده بودند پس از جمع‌آوری به‌صورت جداگانه در کیسه نایلونی تمیز قرار داده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه در برودت یخچال تا زمان آزمایش نگهداری شد. این نمونه‌ها را ابتدا آسیاب و به‌صورت پودر درآورده و بعد ۱۰ گرم از نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ژلاتین مخلوط و به‌صورت مایع درآمدند.

نمونه‌های دوغ

تعداد ۸۰ نمونه از دوغ سنتی تولید شده در شیشه‌های درپوش‌دار استریل از محل‌های تولید جمع‌آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد. به‌دلیل مایع بودن نمونه‌های دوغ فقط همگن‌سازی در زمان کشت انجام شد.

کشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های غنی‌سازی

برای غنی‌سازی *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ A، از محیط گوشت پخته (مرک، آلمان) استفاده شد.

هر نمونه مورد آزمایش را با استفاده از همزن، همگن کرده و ۵-۳ گرم یا ۵ میلی‌لیتر از آن به دو لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط گوشت پخته منتقل شد و پس از ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در حمام آب ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۷-۵ روز در دماهای ۳۵ و ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط بی‌هوازی انکوبه شد. برای ایجاد شرایط بی‌هوازی از جار بی‌هوازی و گازپک نوع A، انایروکولت (مرک، آلمان) استفاده شد. پس از انکوباسیون، ۱ میلی‌لیتر از محیط پس از غنی‌سازی برداشته و به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته و برای استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. همچنین از نمونه‌های غنی‌سازی شده روی محیط آگار خوندار (کیولب، کانادا) و CBI (کیولب، کانادا) کشت خطی داده شد و در شرایط بی‌هوازی به مدت ۵ روز در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد (Saadati *et al*., 2006).

کلنی‌های تشکیل شده روی محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفت و از کلیه کلنی‌های مشکوک به *کلستریدیوم بوتولینوم* رنگ‌آمیزی گرم انجام و باکتری‌های رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ با درشت‌نمایی ۱۰۰۰ مشاهده شد. باسیل‌های گرم مثبت شناسایی شده برای

Archive of SID
www.SID.ir

خالص‌سازی دوباره بر روی آگار خوندار کشت و گرمخانه‌گذاری شدند.

آزمون مولکولی (Multiplex PCR)

این مرحله شامل استخراج DNA، مراحل آزمون PCR و آنالیز محصولات PCR می‌باشد. ابتدا میکروتیوب‌های حاوی محیط غنی‌سازی شده از فریزر خارج شده و در دمای محیط قرار گرفتند تا از حالت انجماد خارج شوند. سپس استخراج DNA به سه روش فنل/کلروفرم، جوشاندن و استفاده از کیت (Bioneer، کره جنوبی) انجام شد.

پرایمرهای F و R از تیپ‌های A، B و E *کلستریدیوم بوتولینیوم*، براساس مقاله Saadati و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	سکانس پرایمر (از سمت چپ، '۵ به'۳)	جایگاه بر روی ژن کدکننده سم	طول محصول PCR (bp)
A_f	AGCTACGGAGGCAGCTATGTT	۱۷۸۸-۱۸۰۸	۷۸۲
A_r	CGTATTTGGAAAGCTGAAAAGG	۲۵۶۹-۲۵۴۸	
B_f	CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA	۴۳۴-۴۵۳	۲۰۵
B_r	CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG	۶۳۸-۶۱۹	
E_f	CCAAGATTTTCATCCGCCTA	۱۵۶-۱۷۵	۳۸۹
E_r	GCTATTGATCCAAAACGG	۵۴۴-۵۲۵	

برای شناسایی باکتری، از تشخیص ژن *Bont/A*، *Bont/B* و *Bont/E* و به کمک طراحی پرایمرهای نام برده شده، استفاده شد (Saadati *et al.*, 2006). سکانس نوکلئوتیدی این پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده‌است.

در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مواد غذایی، بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی شیراز، آزمایش PCR با استفاده از DNAهای استخراج شده به‌عنوان الگو که در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شد، انجام شد. حجم مخلوط واکنش در هر میکروتیوب ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

آنگاه از نمونه‌های غنی شده در محیط گوشت پخته برای انجام مراحل PCR به دستگاه ترموسایکلر (بیونیر، کره جنوبی) انتقال یافت که مراحل PCR به‌ترتیب انجام شد. پس از اتمام مراحل، نمونه‌ها تا زمان آنالیز محصولات، در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آنالیز محصولات PCR

محصولات PCR شده از فریزر خارج و مورد آنالیز قرار گرفتند. برای این کار، ابتدا با استفاده از پودر آگاروز (سیناژن، ایران) و بافر TAE، ژل ۱/۵٪ تهیه شد و بعد ماده اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی DNA به میزان ۱۵ میکرولیتر به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول به آن اضافه و داخل سینی تهیه ژل ریخته شد. پیش از سرد و منعقد شدن ژل (در درجه حرارت حدود ۵۵ درجه سلسیوس)، به‌وسیله شانه‌گذاری، چاهک‌ها ایجاد شدند. پس از سرد و منعقد شدن ژل، شانه خارج و سینی در تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR شده با ۲ میکرولیتر بافر راهنما مخلوط گردید و درون چاهک اول ریخته شد. تانک الکتروفورز به دستگاه مولد نیرو متصل و شدت جریان الکتریکی دستگاه بر روی ۱۰۰ میلی‌آمپر تنظیم گردید. پس از گذشت حدود یک ساعت، ژل از تانک خارج شده و زیر اشعه UV با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

UV transilluminator ارزیابی شد و باندها در صفحه مانیتور مشاهده و با مقایسه اندازه باند نمونه‌ها با مارکر، نتیجه تفسیر شد.

تعیین توالی

برای تأیید تیپ‌های جدا شده از نمونه‌ها، توالی‌یابی نیز انجام شد. به این صورت که پس از آنالیز محصولات PCR، خالص‌سازی از ژل با استفاده از کیت خالص‌سازی PCR (سیناژن، ایران) انجام شد. پس از این مرحله، محصول بدست آمده بر روی ژل ۱/۵٪ آنالیز شد و پس از تأیید اندازه باندهای بدست آمده برای تعیین توالی ارسال گردید (ماکروژن، کره جنوبی). پس از انجام تعیین توالی، نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار BLAST تجزیه و تحلیل گردید و با داده‌های موجود در بانک ژن (NCBI/Gene Bank) مقایسه شد. نتایج توالی نشان داد که ۹۷٪ با سویه *CDC3281 BoNT/B کلستریدیوم بوتولینوم* مطابقت داشت.

تهیه اسانس

گیاه کلپوره از ارتفاعات شهرستان اقلید واقع در استان فارس جمع‌آوری شد و اندام‌های دارویی مورد نظر (برگ و گل) پس از برداشت در شرایط دمای اتاق و در سایه به‌طور مجزا روی کاغذ پهن شدند. پس از خشک کردن طبیعی اندام‌های گیاه، توسط دستگاه کلونجر اسانس‌گیری از گل و برگ گیاه به‌صورت جداگانه انجام شد. برای افزایش حلالیت و گسترش یکنواخت هر یک از غلظت‌های اسانس در محیط کشت از دی‌متیل سولفوکسید ۱۰٪ (DMSO) (مرک، آلمان) به‌عنوان امولسیفایر استفاده گردید. غلظت‌های اسانس کلپوره به‌صورت رقت‌های سریالی دوتایی تعیین شد (Mahboubi & Haghi, 2008).

آنالیز ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس

اسانس گیاه پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-Mass) تزریق شد. مشخصات دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی از نوع Agilent technologies و مدل 5975C، ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۶۰ تا ۲۱۰ درجه سلسیوس با افزایش دمای سه درجه سلسیوس در دقیقه و ۲۱۰ تا ۲۴۰ با افزایش دمای ۲۰ درجه سلسیوس در دقیقه، دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سلسیوس، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و گاز حامل هلیوم بود.

تعیین مقدار دوز تلقیح باکتری

باکتری از میکروتیوب استریل به ۷ میلی‌لیتر محیط TPGY (مرک، آلمان) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. دوباره کشت دومی نیز به همان صورت انجام شد. سپس جذب نوری مقادیر مختلفی از کشت آبگوشت ۲۴ ساعته دوم در کووت‌های مختلف را با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، خوانده شد. از محتویات لوله‌های کووت، با استفاده از تهیه سری رقت و کشت سطحی مقدار باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص و در نهایت تعداد 10^6 سلول در مول به محیط کشت تلقیح گردید.

تعیین اثر ضدباکتریایی اسانس

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بر روی محیط کشت آگار خوندار به‌صورت سطحی منتقل شد. سپس دیسک‌های استریل حاوی ۱۰ میکرولیتر از اسانس بر روی سطح آگار کاشته شد و برای ۵ روز در ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط بی هوازی گرمخانه‌گذاری گردید و بعد قطر هاله‌های عدم رشد باکتری اندازه‌گیری شد.

تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس کلپوره

برای تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس کلپوره از روش براث میکرودایلوشن در پلیت‌های با حجم ۳۰۰ میکرولیتری استفاده شد. در هر چاهک ۱۶۰ میکرولیتر محیط آبگوشت قلب و مغز استریل،

Archive of SID
www.SID.ir

۲۰ میکرولیتر از هریک از رقت‌های اسانس و ۲۰ میکرولیتر از کشت باکتریایی اضافه شد. کنترل های مثبت و منفی در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه کاملاً مخلوط شده و برای ۵ روز در ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس چاهک‌ها برای وجود کدورت مورد بررسی قرار گرفتند و حداقل غلظتی که ایجاد حالت عدم رشد (عدم کدورت) را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد، به‌عنوان غلظت مهاری حداقل تعیین شد (Rivas *et al.*, 2010).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام و برای مقایسه دو روش آزمایشی کشت و آزمون PCR، از آزمون مک‌نمار و برای مقایسه رقت‌های مختلف اسانس گل و برگ گیاه کلپوره از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد.

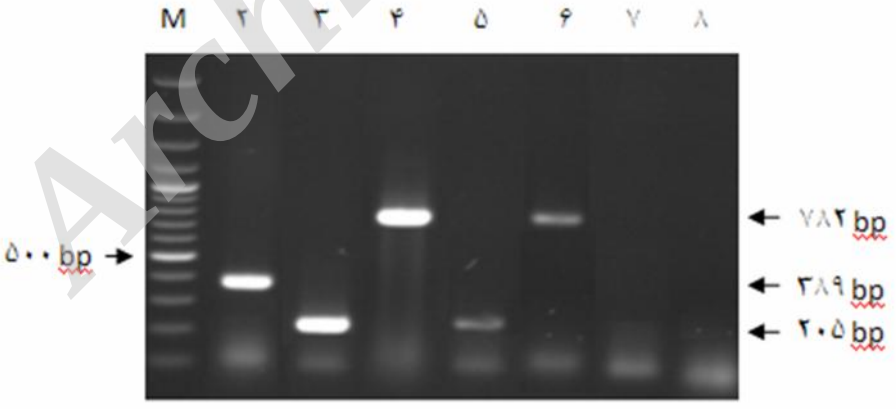
نتایج

در این مطالعه، کلیه نمونه‌ها برای تأیید و تشخیص هویت مولکولی، توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در PCR از نمونه‌های مورد نظر، نمونه‌های کنترل مثبت و منفی و بعد آنالیز محصولات به‌وسیله ژل الکتروفورز، باند تیپ A *کلستریدیوم بوتولینوم* با اندازه ۷۸۲ جفت باز و تیپ B باکتری با اندازه ۲۰۵ جفت باز در موارد مثبت بدست آمد. ضمناً صحت اندازه باندهای بدست آمده با باند مربوط به کنترل مثبت تیپ A و B یکسان بود که در تصویر ۱ نشان داده شده‌است (شکل ۱).

میزان آلودگی به اسپور این تیپ‌ها در ۸۰ نمونه دوغ با استفاده از هر دو روش کشت و MPCR، ۱/۲۵٪ بود (۱ مورد تیپ A).

در ۸۰ نمونه کشک با استفاده از روش کشت هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نشد اما در روش MPCR، ۳ مورد (۲ مورد تیپ B و ۱ مورد تیپ A) جداسازی شد و میزان آلودگی ۳/۷۵٪ بود.

ارزیابی همانندی دو روش آزمایش انجام‌شده نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین روش کشت میکروبی و MPCR می‌باشد. میزان معنی‌داری آزمون برابر با ۰/۰۳۱ است ($P<0.05$).



شکل ۱- آزمایش PCR برای تعیین نمونه‌های مثبت و منفی *کلستریدیوم بوتولینوم*

M: مارکر (۱۰۰ جفت باز)- ۲: نمونه کنترل مثبت (تیپ E با اندازه ۳۸۹ جفت باز)- ۳: نمونه کنترل مثبت (تیپ B با اندازه ۲۰۵ جفت باز)
۴: نمونه کنترل مثبت (تیپ A با اندازه ۷۸۲ جفت باز)- ۵: نمونه مثبت B (با اندازه ۲۰۵ جفت باز)- ۶: نمونه مثبت A (با اندازه ۷۸۲ جفت باز)- ۷: نمونه کنترل منفی- ۸: نمونه کنترل منفی

Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز اسانس

نتایج آنالیز اسانس گل کلپوره در جدول ۲ نشان داده شده‌است. از ۵۲ نوع ترکیب مختلف، بیشترین میزان مربوط به آلفا-پینن (۱۶/۷٪) است.

نتایج آنالیز اسانس برگ کلپوره در جدول ۳ نشان داده شده‌است. از ۵۵ نوع ترکیب مختلف، بیشترین میزان مربوط به آلفا-پینن (۱۴/۸٪) است.

جدول ۲- ترکیب‌های حاصل از آنالیز گل کلپوره

ردیف	ترکیب	درصد	ردیف	ترکیب	درصد
۱	*α*-pinene	۱۶/۷	۱۳	myrtenal	۲/۹
۲	thuja-2,4(10)-diene	۱/۱	۱۴	verbenone	۴/۸
۳	*β*-pinene	۸/۱	۱۵	*trans*-carveol	۱/۲
۴	myrcene	۴/۱	۱۶	bornyl acetate	۲/۲
۵	limonene	۵/۶	۱۷	(E)-caryophyllene	۱/۳
۶	*trans*-pinocarveol	۳/۴	۱۸	*α*- agarofuran	۲/۰
۷	*cis*-verbenol	۱/۴	۱۹	elemol	۵/۷
۸	*trans*-verbenol	۵/۹	۲۰	10-epi-γ-eudesmol	۲/۹
۹	pinocarvone	۱/۳	۲۱	*β*-eudesmol	۲/۷
۱۰	*trans*-pinocarveol	۳/۴	۲۲	valerianol	۸/۳
۱۱	borneol	۱/۱	۲۳	7-epi-*α*-eudesmol	۶/۲
۱۲	10-epi-*β*-eudesmol	۲/۹	۲۴	سایر ترکیب‌ها	۳/۷

جدول ۳- ترکیب‌های حاصل از آنالیز برگ کلپوره

ردیف	ترکیب	درصد	ردیف	ترکیب	درصد
۱	*trans*-verbenol	۱/۳	۹	(E)-caryophyllene	۵/۸
۲	*α*-pinene	۱۴/۸	۱۰	germacrene d	۱۰/۴
۳	*β*-pinene	۹/۸	۱۱	bicyclogermacrene	۶/۲
۴	myrcene	۱۰/۹	۱۲	*γ*-cadinene	۲/۳
۵	limonene	۹/۹	۱۳	spathulenol	۶/۶
۶	(E)-*β*-ocimene	۲/۸	۱۴	caryophyllene oxide	۳/۳
۷	*β*-elemene	۱/۱	۱۵	سایر ترکیب‌ها	۱۳/۶
۸	*β*-bourbonene	۲/۱			

تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس

به‌منظور بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس کلپوره بر روی *کلستریدیوم بوتولینوم*، ابتدا قطر هاله عدم رشد باکتری در رقت‌های ۴۰µl/ml و ۸۰ اسانس برگ به‌ترتیب ۹ و ۸ میلی‌متر و اسانس گل ۱۲ و ۸ میلی‌متر ثبت شد و بعد حداقل غلظت مهاری (MIC) اسانس ۱۶۰µl/ml تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری واریانس بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس نشان داد که بین سه غلظت ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0.05$). همچنین

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت‌های ۴۰µl/ml و ۸۰ به‌طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد باکتری شدند ($P<0.05$).

بحث

با توجه به اهمیت *کلستریدیوم بوتولینوم* به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای قابل انتقال از مواد غذایی به‌ویژه فرآورده‌های گوشتی و مواد غذایی بسته‌بندی شده در خلأ مطالعات زیادی برای کنترل این باکتری و همچنین مواد نگهدارنده طبیعی و گیاهی انجام شده‌است.

Tavakoli و همکاران (۲۰۰۹) از ۱۳۱ نمونه (۵۷ نمونه پنیر، ۱۱ نمونه کشک، ۶۳ نمونه ماهی نمک سود) ۱۲ نمونه را با استفاده از روش سنجش زیستی موش مثبت تشخیص دادند. در این مطالعه از نمونه‌های کشک سنتی هیچ‌یک آلوده به *کلستریدیوم بوتولینوم* نبود اما ۴ مورد در ماهی تیپ‌های A، B، E (۳/۰۶٪) و ۲ مورد در پنیر تیپ A (۱/۵۲٪) شناسایی شد.

Hydarnia و Memarbashi (۱۹۹۸)، وجود توکسین بوتولینوم را در فرآورده‌های لبنی استفاده شده در آش محلی گزارش کردند. در سال‌های اخیر ۹ مورد مسمومیت بوتولیسمی به‌دلیل مصرف کشک گزارش شده‌است.

کشک خشک با ۲/۱۴±۱۴/۲٪ رطوبت و pH برابر ۰/۲۴±۴/۲۷ و نمک ۱/۴۴±۹/۷۷٪ دارای ۳/۱۰±۹/۱۷ چربی و ۳/۵۷±۵۱/۷۴ پروتئین، از دوغ پس از کره‌گیری تهیه می‌شود.

در ایران تاکنون احتمال آلودگی این فرآورده لبنی سنتی (با روش‌های مولکولی) که ممکن است در طی فرایند تولید به *کلستریدیوم بوتولینوم* آلوده شود مورد بررسی قرار نگرفته بود. کشک سنتی ممکن است در انتهای فرایند تولید و در مرحله خشک کردن به اسپور این باکتری آلوده شود که بهتر است در مطالعه‌ای تکمیلی اثر اسانس‌ها و نیز اثر مواد مهم دیگر مانند نیترات سدیم که در رشد باکتری تأثیر مستقیم دارد، بررسی شود. اما به‌دلیل پایین بودن pH و رطوبت بندرت ممکن است حاوی سم باکتری باشد. غذاهای سنتی مانند ترخینه (نوعی آش) که در آنها کشک مورد استفاده قرار می‌گیرد توانسته است سبب ابتلا مصرف‌کنندگان به مسمومیت بوتولیسمی گردد (Hydarnia & Memarbashi, 1998؛ Soltani & Güzeler, 2013).

دوغ نیز با pH حدود ۴ وضعیتی مشابه کشک دارد. اما دوغ در طی تولید، فرایند حرارتی کمتری نسبت به کشک دارد و میزان رطوبت آن نیز حدود ۷۵٪ می‌باشد.

در این مطالعه از ۱۶۰ نمونه جمع‌آوری شده از فرآورده‌های لبنی سنتی (کشک و دوغ) با استفاده از روش کشت در ابتدا نمونه‌ها در محیط گوشت پخته غنی‌سازی شده و بعد بر روی محیط آگار خوندار پاساژ داده شد. ضمناً از نمونه‌های غنی‌سازی شده برای انجام PCR استفاده شد. ۱ مورد (۰/۶۲٪) و روش MPCR، ۴ مورد (۲/۵٪) آلودگی به تیپ A و B *کلستریدیوم بوتولینوم* شناسایی گردید. این میزان آلودگی با مطالعات Tavakoli و همکاران (۲۰۰۹) در فرآورده‌های لبنی سنتی مطابقت دارد.

از مجموع ۴ مورد مثبت، ۵۰٪ تیپ A و ۵۰٪ تیپ B جداسازی گردید.

در آنالیز اسانس گل و برگ کلپوره، مشخص گردید که بیشترین ترکیب‌های موجود در اسانس گل، آلفا-پینن (۱۶/۶۷٪) و والریانول (۸/۳۲٪) و در اسانس برگ آن آلفا-پینن (۱۴/۷۹٪)، میرسن (۱۰/۹٪) و جرماکرن D (۱۰/۴۴٪) بود. در مطالعات Mahmoudi و Nosratpour (۲۰۱۳) از آنالیز اسانس کلپوره ۲۱ ترکیب شناسایی شد که ترکیب های اصلی آن شامل اسپاتولنول (۱۵/۰۶٪)، بتا-پینن (۱۱/۰۲٪)، میرسن (۱۰/۰۵٪)، جرماکرن B (۱۰/۱۱٪) و جرماکرن D (۸/۱۵٪) می‌باشد.

نتایج حاصل از آنالیز اسانس با سایر مطالعات، به‌طور نسبی مطابقت دارد. البته تفاوت‌هایی که در میزان ترکیب‌های موجود در اسانس‌ها مشاهده می‌شود به‌دلیل تفاوت در مرحله رشد گیاه و شرایط جغرافیایی مانند حرارت، رطوبت نسبی و میزان تابش نور خورشید می‌باشد (Telci *et al.*, 2010).

در این مطالعه حداقل غلظت مهاری اسانس گل و برگ کلپوره ۱۶۰µl/ml تعیین شد و در غلظت‌های

Archive of SID
www.SID.ir

۴۰µl/ml و ۸۰ از رشد باکتری بر روی محیط کشت ممانعت بعمل آورد. البته گزارشی از تأثیر اسانس این گیاه بر روی *کلستریدیوم بوتولینوم* در منابع خارجی یافت نشد، ولی اثرات ضدباکتریایی اسانس کلپوره در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه Chedia و همکاران (۲۰۱۳) اثر عصاره کلپوره بر روی انواعی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی به‌طور معنی‌داری مشخص شد و قطر هاله‌های عدم رشد بین ۱۳ تا ۱۵ میلی‌متر و حداقل غلظت مهاری ۲۵-۱۲/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تعیین گردید.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که قسمتی از واکنش بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم در اثر اسانس گل یا برگ کلپوره با بررسی‌های بیشتر بر روی اثر ضدمیکروبی آن در مدل‌های غذایی، می‌توان به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در فرآوری مواد غذایی و یا جایگزینی برای نیتریت در فرآورده‌های گوشتی استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

- Abdollahi, M., Karimpour, H. and Monsef-Esfehani, H.R., 2003. Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. Pharmacological Research, 48: 31-35.
- Baldwin, M.R., Bradshaw, M., Johnson, E.A. and Barbieri, J.T., 2004. The C-terminal of botulinum neurotoxin type a light chain contributes to solubility, catalysis, and stability. Protein Expression and Purification, 37: 187-195.
- Chedia, A., Ghazghazi, H., Brahim, H. and Maaroufi, A., 2013. Secondary metabolite, antioxidant and antibacterial activities of *Teucrium polium* L methanolic extract. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4(8): 1790-1797.
- Evrendilek, G.A. and Balasubramaniam, V.M., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. Food Control, 22(8): 1435-1441.
- Fayaz, M., 2013. Distribution of Medicinal Plants in Khorasan Razavi. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, 215p.
- Gharaibeh, M.N., Elayan, H.H. and Salhab, A.S., 1988. Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. Journal Ethnopharmacology, 24: 93-99.
- Hasani Tabatabaei, A. and Firozi, R., 2002. Animal Bacterial Diseases. Tehran University, 541p.
- Hydarnia, A. and Memarbashi, H., 1998. Survival of *Clostridium botulinum* in Traditional Kashks. International Hygiene and War Congress, Ahvaz University of Medical Sciences, Iran, 22-24.
- Mahboubi, M. and Haghi, Gh., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 119(2): 325-327.
- Mahmoudi, R. and Nosratpour, S., 2013. *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties. International Food Research Journal, 20(4): 1697-1701.
- Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R., 2010. Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Churchill Livingston, Philadelphia, 4320p.
- Mazokopakis, E., Lazaridou, S., Tzardi, M., Mixaki, J., Diamantis, I. and Ganotakis, E., 2004. Acute cholestatic hepatitis caused by *Teucrium polium*. Phytomedicine, 11: 83-84.
- Mortazavi, A. and Sadeghi Mahonak, A., 2007. Food Microbiology. Ferdowsi University, 261p.
- Noriega, E., Newman, J., Saggers, E., Robertson, J., Laca, A., Diaz, M. and Brocklehurst, T.F., 2010. Antilisterial activity of carrots effect of temperature and properties of different carrot fractions. Food Research International, 43(10): 2425-2431.
- Pier, C.L., Chen, C., Tepp, W.H., Lin, G., Janda, K.D., Barbieri, J.T., Pellett, S. and Johenson, E.A., 2011. Botulinum neurotoxin subtype A2 enters neuronal cells faster than subtype A1. Federation of European Biochemical Societies Letters, 585: 199-206.
- Rasekh, H.R., Khoshnood-Mansourkhani, M.J. and Kamalinejad M., 2001. Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. Fitoterapia, 72(8): 937-939.
- Razavilar, V., 2000. Foodborne diseases. Tehran University Journal, 163-168.
- Rebagliati, V., Philippi, R., Tornese, M., Paiva, A., Rossi, L. and Troncoso, A., 2009. Food-borne botulism in Argentina. Journal of Infection in Developing Countries, 3(4): 250-254.
- Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., Obrien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S. and Duffy, G., 2010. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen system by carvacrol and thymol. International Journal of Food Microbiology, 139(1-2): 70-78.
- Saadati, M., Nazarian, Sh., Tavallaei, M., Amani J. and Shirzad, H., 2006. Identification of *Clostridium botulinum* Type A by Multiplex PCR. Journal of Military Medicine, 2(1): 231-238.

Archive of SID

www.SID.ir

http://cfsan.fda.gov/ebam/bam-17.htm#authors (accessed on December 2006).
- Soltani, M. and Güzeler, N., 2013. The production and quality properties of liquid kashks. GIDA, 38: 1-7.
- Tavakoli, H.R., Zinali, M. and Mehrabi Tavana, A., 2009. Scrutiny of food-borne botulism intoxication in Iran during 2003-2007 with the food hygiene view point. Hakim Health Systems Research Journal, 11(4): 38-46.
- Telci, I., Demirtas, I., Bayram, E., Arabaci, O. and Kacar, O., 2010. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Menthe spicata* L.). Industrial Crops and Products. 32(3): 558-592.
- Tseng, C.K., Tsai, C.H., Tseng, C.H., Tseng, Y.C., Lee, F.Y. and Huang, W.S., 2009. An outbreak of foodborne botulism in Taiwan. International Journal of Hygiene and Environment Health, 212: 82-86.
- Sanford Malcolm, T., Atkinson, E. and Ellis, J., 2009. Infant botulism and honey. Thesis of The Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Satterfield, B.A., Stewart, A.F., Lew, C.S., Pickett, D.O., Cohen, M.N., Moore, E.A. and Robison, R.A., 2010. A quadruplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of the *Clostridium botulinum* toxin genes A, B, E and F. Journal of Medical Microbiology, 59: 55-64.
- Shahcheraghi, F., Nobari, S., Vahdani, P., Majdian G. and Aslani, M.M., 2013. Case report of cause *Clostridium botulinum* Type A. Mazandaran Medical Science Journal, 29(96): 127-132.
- Simpson, L., 2013. The life history of a botulinum toxin molecule. Toxicon, 68:40-59.
- Solomon, H.M. and Lilly, T., 2001. *Clostridium botulinum*. FDA Bacteriological Analytical Manual online, 8th edn. Chapter 17.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of *Teucrium polium* L. essential oil on the growing of *Clostridium botulinum* type A identified from traditional dairy products

M.V. Sadeghi Sarvestani[1*], S. Hosseinzadeh[2], M. Osfoori[3], V. Rowshan[4], M. Ghasemi nejad[3] and M. Eghtedari[3]

1*- Corresponding author, Fars Agricultural Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran, E-mail: vahidsadeghi130@yahoo.com
2- Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3- Fars Agricultural Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran
4- Department of Natural Resources, Fars Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

Received: April 2015 Revised: May 2015 Accepted: June 2015

Abstract

Clostridium botulinum is one of the major causes of bacterial food intoxication especially in the vacuum-packed foods and meat products. Preventing such contamination is a major concern in the food industries. The current study was aimed to investigate the presence of *Clostridium botulinum* type A in the traditional dairy products and the possible effects of *Teucrium polium* L. essential oil (leaf and /or flower) on the growing of microorganism, *in vitro*. Out of 160 samples of traditionally made kashk and dough, only one sample was isolated (type A) using the selective culture, while, one sample of dough (1.25%) and two cases (3.75%) of kashk were respectively found positive to type A and B of the bacteria, using multiple PCR assay. The major components of the flower extract were: α-Pinene (16.67%) and Valerianol (8.32%), and for the leaf extract: α-Pinene (14.79%), Myrcene (10.9%) and Germacrene (10.44%), were the major components. In order to evaluate the anti-microbial effects of the leaf and flower, 10 µl of each extract was employed using the disc diffusion technique. At 40 and 80 µl/ml essential oil concentrations, the diameters of the growing inhibition zones were 9 and 8 millimeters for the leaf essential oil, and 12 and 8 millimeters for flower essential oil. The minimum inhibitory concentration (MIC) of both essential oil was 160µl/ml. The results of the present study may recommend the use of *Teucrium polium* L. essential oil as a natural component to reduce and/or to inhibit the growing of *Clostridium botulinum*, in foodstuffs.

Keywords: *Clostridium botulinum*, *Teucrium polium* L., essential oil, traditional dairy products, MPCR, MIC.

Archive of SID

www.SID.ir