

ارزیابی تاثیر نیتريت، pH، نمک، حرارت و زمان بر روی توان رشد و توکسين زايی *Clostridium botulinum* تیپ A در محیط مدل BHI

• زهره مشاک

استادیار گروه بهداشت مواد غذایی - دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی کرج

• ودود رضوی

دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی - دانشکده تخصصی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران
تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: دی ماه ۱۳۸۶

Email: zohrehmashak8@gmail.com

چکیده

در این مطالعه تداخل اثر متقابل عوامل درون اثر و برون اثر نظیر نیتريت، pH، نمک، حرارت و زمان نگهداری بر روی رشد و توکسين زايی *Cl. perfringens* تیپ A در طی سه مرحله مورد بررسی قرار گرفته است در مرحله اول هاگزایی باکتری کلستریدیم بوتولینم تیپ A در محیط EYA انجام شد و تعداد هاگ در یک میلی لیتر از سوسپانسیون حاصل شد در مرحله دوم؛ مدت زمان کدورت با میزان تلقیح 4×10^4 هاگ در هر میلی لیتر از آگوشت Brain Heart Infusion به ترتیب با دو میزان pH (۵/۵ و ۶/۵)، سه غلظت نمک (۵/۵ و ۳/۵ و ۶/۵) درصد، سه میزان درجه حرارت (۳۵ و ۲۵ و ۱۵) سانتی گراد و بالاخره کاربرد تیمار نیتريت ۸۰ ppm و عدم آن (تیمار شاهد) در طی ۳۲ روز نگهداری (۲ و ۸ و ۱۶ و ۳۲) مورد مطالعه قرار گرفت. در مرحله سوم به روش زیست سنجی و بر طبق دستورالعمل USDA آزمایشات تعیین توکسين نمونه های کدر در موش انجام شد. نتایج حاصله در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش ANOVA و تجزیه صفت زمان کدر شدن Time to turbidity و صفت زمان توکسين زايی Time to toxicity در برنامه کامپیوتری SAS، Version ۹ ارائه گردیده است. نتایج نشانگر اختلاف آماری معنی دار در بین مقادیر مختلف نمک، pH، حرارت و تیمار نگهدارنده در طی زمانهای کدورت بود ($P > 0.0001$). استفاده از غلظت نمک ۰/۶، pH: ۵/۵ و حرارت ۱۵ سانتی گراد و تیمار نیتريت سدیم (۸۰ ppm) و شاهد در طی ۳۲ روز نگهداری توانست از رشد و توکسين زايی کلستریدیم بوتولینم تیپ A با تلقیح 4×10^4 باکتری جلوگیری به عمل آورد. کاربرد نمک ۳٪ در مقایسه با نمک ۰/۵ درصد و درجه حرارت ۲۵ سانتی گراد در مقایسه با ۳۵ سانتی گراد و همچنین استفاده از تیمار نیتريت ۸۰ ppm در مقایسه با شاهد، اثربازدارندگی بیشتری از رشد و توکسين زايی باکتری مزبور در pH: ۶/۵ و در طی ۳۲ روز نگهداری داشت و بالاخره یک اثر جایگزینی بین نمک و نوع تیمار مشاهده شد، به طوریکه کاربرد نمک ۰/۵٪ و تیمار نیتريت ۸۰ ppm با نمک ۳٪ و تیمار شاهد اثر مشابهی در بازدارندگی از رشد و توکسين زايی باکتری کلستریدیم بوتولینم تیپ A نشان دادند.

کلمات کلیدی: *Clostridium botulinum* تیپ A، هاگزایی، زمان کدر شدن، زمان توکسين زايی، نیتريت، pH، نمک، حرارت.

Pajouhesh & Sazandegi No 80 pp: 133 - 142

The evaluation of effects of nitrite, PH, salt, temperature and storage of time on growth and toxigenesis of *Clostridium botulinum* type A in BHI model.

By: Z. Moshak, Assitant Professor of Islamic Azad University, Karaj , Iran. Razavilar V. Associated Professor of Islamic Azad University, Tehran, Iran.

In this study, the interference in interaction between intrinsic and extrinsic parameters including nitrite, pH, salt, temperature and storage time on growth and toxigenesis of *Clostridium botulinum* type A, has been examined during three steps. In the first step, sporogenesis of *Clostridium botulinum* type A was done on Egg yolk Agar and spore count in one milliliter of suspension was obtained. In the second step, the turbidity time with inoculation level of 4×10^4 spore in each milliliter of BHI broth was examined within 32 days of storage (2,4,8,16,32) considering two level of pH (5.5,6.5), three different salt concentration (0.5,3,6)%, three different temperature (15,25,35) °C and finally usage of nitrite treatment of 80 ppm (or not using that, i.e. control treatment). In the third step toxigenesis was performed according to the USDA instruction and mouse bioassay. The results evaluated with completely randomized ANOVA, in SAS system, version 9 and indicated a significant statistical differences among different concentration of salt, pH, temperature and nitrite within turbidity times ($p < 0.0001$) 6% salt, pH:5.5, temperature of 15 °C and sodium nitrite (80ppm) and control treatment within 32 days of storage inhibit growth and toxigenesis of *Clostridium botulinum* type A with inoculum size level of 4×10^4 cfu/ml in contrast with salt (0.5,3)%, pH:6.5 and temperature (25,35) °C. In pH 6.5, 3% salt, temperature 25 °C and sodium nitrite treatment had more inhibitory effect in contrast with pH:6.5, 0.5% salt, temperature 35 °C and with control treatment. And finally in growth and toxigenesis of bacteria observed a substitute effect between 0.5% salt and nitrite treatment compared to 3% salt and control treatment.

Key words: *Clostridium botulinum* type A, Sporogenesis, Turbidity, Time to toxicity, Nitrite, pH, Salt, Temperature**مقدمه**

باکتری *Cl. botulinum* از خانواده کلوستریدیاسه، جنس کلوستریدیوم و گونه بوتولینوم می باشد باکتری مزبور گرم مثبت، بی هوازی، متحرک، فاقد کپسول و میله ای شکل می باشد. دو طرف باسیل موازی و دو سر آن گرد است. هاگ آن بیضی شکل و نزدیک به انتهایی بوده سبب پیدایش برجستگی در این محل می شود. هاگ نماینده یک مرحله استراحت و فرم مقاوم باکتری محسوب شده در شرایط نامناسب نظیر حرارت، سرما، خشکی، مواد شیمیایی و تشعشعات زن هاگ زایی بارز می گردد.

هاگ ها تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی مساعد و در طی سه مرحله فعال سازی^۱، آغاز^۲ (در این مرحله ژرمیناسیون هاگ صورت می پذیرد) و مرحله خروج^۳ به فرم رویشی^۴ تبدیل می شود. بعد از ازدیاد فرم رویشی و اتولیز آنها، نورو توکسین ترشح می شود که با اگزوتوکسین کلاسیک تفاوت دارد زیرا توکسین در دوره رشد باکتری ترشح نمی شود. توکسین تیپ های مختلف کلوستریدیوم بوتولینوم دارای اثرات ساختاری و فارماکولوژیکی مشابه بر روی میزبان بوده و از لحاظ آنتی ژنتیکی به هفت نوع توکسین A تا G تقسیم بندی می شود. گونه های *Cl. botulinum* بر حسب واکنش های بیوشیمیایی به دو فرم پروتئولیتیک و غیر پروتئولیتیک تقسیم می شوند. تیپ A در گروه پروتئولیتیک قرار دارد و شرایط مطلوب رشد آن از نظر حرارت

۳۵ سانتی گراد ۴/۶-۸/۵ pH، ۰/۹۴ aw، mv -۳۵۰ Eh و نمک بازدارنده کمتر از ۱۰ درصد بوده و در شرایط بی هوازی رشد می نماید.

هاگ باکتری به طور وسیعی در خاک، رسوبات دریایی، نهرها و دریاچه ها، گیاهان ریشه ای و سبزیجات و روده ماهیها و حیوانات و... پراکنده می باشد و می تواند از طریق غذای گیاهی و حیوانی خام منتقل شده در اثر فرآوری و ایجاد شرایط نامساعد محیطی در غذا باقی مانده سبب رشد و توکسین زایی شود (۱، ۲، ۷، ۱۴، ۲۰، ۲۵).

لذا با توجه به سهولت و انتشار باکتری *Cl. botulinum* از سویی و خصوصیات خاص فیزیولوژیک و فارماکولوژیک آن از سوی دیگر و همچنین گسترش ارتباطات بین المللی، افزایش فرآورده های غذایی متنوع حاوی اجزاء متشکله مختلف و تنوع فرآوری ها، خطر متوکسینومیت بوتولیتوکسینی به عنوان یک معضل بالقوه در مواد غذایی بیش از پیش مطرح می باشد.

توکسین تیپ A از قوی ترین توکسینوم شناخته شده در دنیا می باشد که دارای کشندگی بالایی می باشد به طوریکه یک میکروگرم توکسین خالص آن دارای حداقل دوز^۵ کشنده حدود ۲۰۰/۰۰۰، برای موش آزمایشگاهی ۲۰ گرمی است و میزان کشنده آن برای انسان کمتر از یک گاما گرم است (۶، ۷، ۱۵، ۲۰).

متوکسینومیت ناشی از بوتولیتوکسین غذا زاد بیشتر از اشکال دیگر این

هاگزایی از روز چهارم تا روز پانزدهم که حداکثر هاگ (بیش از ۹۰٪) هاگ آزاد در یک شان میکروسکوپی) مشاهده شده، ادامه داشت. در طی این مدت مشاهدات روزانه ویدیو میکروسکوپی با تهیه لام مرطوب و گسترش رنگ آمیزی با مالاشیت گرین صورت پذیرفت. سپس با استفاده از روش Sweeping کلنی‌های موجود در سطح پلیت‌ها با محلول بافر فسفات با pH ۷/۲ تحت شرایط آسپتیک جمع آوری و به لوله‌های سانتریفوژ ۵۰ میلی لیتری حاوی ساچمه شیشه‌ای (Perls) انتقال داده شده و ۵ بار عمل سانتریفوژ $2000 \times g$ rpm -۱۰۰۰۰ انجام شد و بر روی آن انجام شد و رسوب سفید رنگ حاوی هاگ جمع آوری شد. جهت از بین بردن سلول‌های رویشی در سوسپانسیون حاوی هاگ از تیمار توام حرارتی $100^{\circ}\text{C}/10'$ و تیمار الکل اتیلیک ۷۰٪ استفاده شده بالاخره پس از شستشوی مجدد سوسپانسیون مزبور و استفاده از سانتریفوژ یخچال دار، رنگ آمیزی هاگ و تهیه لام مرطوب جهت اطمینان از تخریب سلول‌های رویشی به عمل آمد.

سپس به منظور تعیین تعداد مشخص هاگ موجود در هر میلی لیتر از سوسپانسیون هاگ پایه دوبار رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه و کشت سطحی از آن در EYA (سه بار تکرار) تحت شرایط بی‌هوازی در ۳۵ سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت به عمل آمد و در خاتمه شمارش هاگ انجام و تا اجرای مرحله دوم در ۴ سانتی گراد نگهداری شد.

ب- تلقیح 4×10^4 هاگ *Cl. botulinum* تیپ A در هر میلی لیتر محیط کشت BHI تحت تاثیر پارامترهای درون اثر و برون اثر نظیر pH، نمک، حرارت و نیتريت در طی ۳۲ روز

در این بررسی مطالعات تلقیحی در دو مرحله جداگانه و در هر مرحله به صورت دوبار تکرار در محیط کشت آبگوشت BHI انجام شد به نحوی که پس از حل کردن مقدار مشخصی از محیط BHI در آب مقطر به کمک حرارت ملایم، توزین و حل کردن نمک با غلظت‌های (۳ و ۵٪) درصد، تنظیم pH هر یک از حالات قبلی به کمک اسید کلریدریک و پتاس یک نرمال و بالاخره افزودن ۸۰ ppm نیتريت صورت گرفت. پس از اتوکلاو لوله‌های در پیچ دار حاوی ترکیبات گفته شده مجدداً تنظیم pH انجام شد در مرحله بعدی لوله‌ها را با درب شل در حمام آب گرم $100^{\circ}\text{C}/10'$ قرار داده، بدون حرکت درب لوله‌ها را محکم پیچ نموده، بلافاصله سرد و ۱ میلی متر از سوسپانسیون هاگ پایه را به طور عمقی به زیر محیط کشت مایع BHI برده و وازپاراستریل بر روی آن ریخته شد. در پایان، هر سه سری لوله ۴۸ تایی به ترتیب در گرمخانه‌های (۱۵، ۲۵، ۳۵) درجه سانتیگراد تحت شرایط بی‌هوازی نگهداری شدند. بازدید و برداشت لوله‌های کدر در طی روزهای (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲) از انکوباتورها صورت پذیرفت. جهت تأیید رشد باکتری در آنها علاوه بر تهیه و گسترش و رنگ آمیزی، مشاهده کلنی‌های مشخص کلستریدیم بوتولینم تیپ A پس از کشت خطی از لوله‌های کدر به محیط کشت حاوی EYA انجام شد.

ج- بررسی توکسین زایی باکتری با انجام آزمایش زیستی بر روی موش بعد از خروج لوله‌های کدر مرحله قبلی از انکوباتورها، سانتریفوژ آنها تحت شرایط $4^{\circ}\text{C}/15'$ rpm ۷۰۰۰ انجام و جهت تعیین توکسین

بیماری نظیر بوتولیتوکسین نوزادان، زخمی و بوتولیتوکسین با منبع ناشناخته می‌باشد. گزارشات حاصله نشانگر آن است که عمده موارد متوکسینومیت بوتولیتوکسین غذایی ناشی از تیپ A پروتئولیتیک گروه I و همچنین تیپ E گروه II می‌باشد.

هاگ‌ها در غذا ژرمینه شده به فرم رویشی درآمده، تکثیر حاصل نموده، نوروتوکسین تولید می‌نمایند که از طریق روده جذب خون شده به گیرنده‌های گانگلیوزیدی بافت عصبی متصل شده و از طریق بلوکه کردن آزادسازی استیل کولین از پایانه‌های کولینرژیک، از انتقال پیام عصبی به عضلات جلوگیری به عمل آورده بعد از ۳۶-۱۲ ساعت سبب فلجی شل می‌گردد همچنین اختلالات گوارشی حاد به همراه کوفتگی، سرگیجه، سردرد، یبوست، دوبینی، اختلال در بلع و تکلم، خشکی دهان، انقباض عضلات گلو، کاهش فشار خون، خونریزی ریه‌ها و فلجی منتشره و نهایتاً اختلالات تنفسی و مرگ ایجاد می‌نماید (۱، ۲، ۶، ۷، ۲۶).

بنابراین با توجه به اهمیت و ابعاد مختلف اقتصادی، اجتماعی، و سیاسی بوتولیتوکسین، که خطری جدی جهت سلامتی غذا و از همه مهمتر جان انسان‌ها می‌باشد لزوم کاربرد ابزارهای خاص کنترلی رشد و توکسین زایی باکتری در غذا ضروری می‌باشد.

امروزه با شناسایی و تداخل اثر فاکتورهای داخلی (intrinsic factors) در رشد باکتری (نظیر Eh، pH، aw و ...) و فاکتورهای خارجی (Extrinsic factors) (نظیر حرارت، حضور گازها، رطوبت نسبی در محیط نگهداری و ...) و همچنین خصوصیات فیزیکی بیوشیمیایی و شیمیایی غذا در قالب مطالعات چالشی تلقیحی ابتدا در محیط کشت آزمایشگاهی و سپس در ماده غذایی استفاده می‌شود (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷، ۲۰).

بنابراین در این مطالعه بعد از انجام هاگزایی با تلقیح 4×10^4 هاگ *Cl. botulinum* تیپ A در محیط کشت (Brain Heart Infusion Broth) BHI تحت شرایط چند فاکتوری نظیر (۵/۵ و ۶/۵) pH، نمک (۳ و ۵٪) درصد، حرارت نگهداری (۳۵ و ۲۵) درجه سانتی گراد و نیتريت (۸۰ ppm) بر روی رشد و توکسین زایی باکتری در طی ۳۲ روز نگهداری (روزهای ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

الف- هاگزایی *Cl. botulinum* تیپ A با استفاده از محیط کشت

جامد و شمارش هاگ

باکتری *Cl. botulinum* تیپ A تهیه شده از کلکسیون میکروبی پروفیسور جنی جورجیس Genigorgis استاد دانشگاه دیویس کالیفرنیا به عنوان مطالعه انتخاب شد. پس از سه بار کشت و پاساژ متوالی باکتری در آبگوشت BHI تحت شرایط بی‌هوازی (با ریختن وازپار استریل Vaspar بر روی محیط کشت و گذاشتن آن در جار بی‌هوازی همراه با $\text{Gaspack A}^{\text{v}}$) و گرمخانه گذاری ۳۵ سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت به محیط‌های کشت Egg yolk Agar به صورت سطحی و پر، کشت و تحت شرایط بی‌هوازی در ۳۵ سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید.

در نمونه‌ها، قوتوکسینت زلال رویی را به لوله های پلی استیرینی درب دار استریل منتقل نموده و تا زمان آزمایش بر روی موش، در ۲۰- درجه سانتی گراد منجمد گردیدند. روش کار بر اساس دستورالعمل پیشنهادی USDA^۸ انجام شد. موشهای مورد آزمایش در موسسه رازی تهیه شده و همگی ماده و outbred با وزن ۱۸-۲۵ گرم و ۶-۸ هفته سن بودند و به ازای هر نمونه، ۴ موش مورد استفاده قرار گرفت. قبل از تزریق به موش ابتدا نمونه ها از انجماد خارج شده، سپس محتویات هر لوله دو قوتوکسینت شده به طوری که بر یکی تیمار حرارتی ۱۰۰ °C/۱۰' و بر روی دیگری تیمار حرارتی صورت نپذیرفت. سپس از هر لوله یاد شده به ۲ موش و به هر یک به میزان ۰/۵ میلی متر داخل صفاقی^۹ تزریق انجام شد (در ۱۶ موش از تیمار حرارتی و در ۱۶ موش دیگر از تیمار غیر حرارتی استفاده شد) و موشها جهت مشاهده علائم بوتولیتوکسین به مدت ۶-۲۴ ساعت تحت مراقبت و نظر قرار گرفتند.

نتایج

الف: نتایج حاصل از هاگ‌زایی و شمارش هاگ‌ها در محیط EYA

شمارش هاگ‌های حاصله در EYA در طی روزهای چهارم تا پانزدهم ادامه داشت و بالاخره با میزان ۱۰^۸ هاگ شمارش گردید. ب: نتایج حاصل از تاثیر عوامل درون اثر و برون اثر (pH، نمک، حرارت و نیتريت) بر روی زمان رشد و توكسين زايی با تعداد تلقیح ۴×۱۰^۴ هاگ *Cl.botulinum* تیپ A در طی ۳۲ روز در محیط مدل BHI. نتایج حاصله در قالب طرح كاملاً تصادفی و تست ANOVA و ارائه تجزیه صفت رشد باكتري (مشاهده كدورت) و صفت توكسين زايی در برنامه كامپیوتری SAS، Version ۹: آمده است: (جدول ۱)

ضمن آنکه در سه درجه حرارت (۳۵، ۲۵ و ۱۵) سانتی گراد، سه غلظت نمک (۳، ۶ و ۰/۵) درصد و دو میزان pH (۵/۵ و ۵/۵) و تیمار نگهدارنده ۸۰ ppm نیتريت و عدم کاربرد نیتريت (شاهد)، اختلاف آماری معنی دار می باشد هیچگونه رشد و توكسين زايی *Cl.botulinum* تیپ A تحت شرایط ۱۵ سانتی گراد، نمک ۰/۶٪ و pH: ۵/۵ مشاهده نشد (جدول ۲).

• اثر متقابل نمک و حرارت نشانگر آن است که کاربرد نمک ۰/۳٪ و حرارت ۲۵ سانتی گراد در مقایسه با نمک ۰/۵ درصد و حرارت ۳۵ سانتی گراد به میزان بیشتری توانسته از رشد و توكسين زايی باكتري جلوگیری کند (نمودار ۱)

• همچنین اثر متقابل pH و حرارت حاکی از آن است که pH: ۶/۵ و حرارت ۲۵ سانتی گراد در مقایسه با حرارت ۳۵ سانتی گراد رشد و توكسين زايی را در مدت طولانی تری ایجاد نموده است (نمودار ۲).

• تاثیر متقابل بین حرارت و تیمار نگهدارنده حاکی از آن است که کاربرد نیتريت سدیم ۸۰ ppm و عدم آن (شاهد) در درجه حرارت های ۳۵ و ۲۵ سانتی گراد توانسته رشد و توكسين زايی را به تعویق بیندازد و این اثر در مورد کاربرد نیتريت ۸۰ ppm در مقایسه با تیمار شاهد کارایی بیشتری را در پیشگیری از رشد و توكسين زايی کلستریديم بوتولینم نشان می دهد (نمودار ۳).

• اثر متقابل نمک و pH نیز رشد و توكسين زايی باكتري مزبور را در مدت طولانی تری در pH: ۶/۵ و غلظت نمک ۰/۳٪ در مقایسه با نمک ۰/۵

درصد نشان می‌دهد (نمودار ۴).

• تاثیر متقابل pH و تیمار نگهدارنده حاکی از آن است که ضمن عدم رشد و توكسين زايی باكتري در pH: ۵/۵، در pH: ۶/۵ کاربرد ۸۰ ppm نیتريت سدیم در مقایسه با شاهد جهت جلوگیری از رشد توكسين زايی بهتر می باشد (نمودار ۵).

• اثر متقابل نمک و تیمار نگهدارنده نشانگر عدم رشد و توكسين زايی باكتري در کاربرد نیتريت سدیم ۸۰ ppm و شاهد با نمک ۰/۶٪ می باشد. و یک اثر جایگزینی بین نمک و تیمار نگهدارنده و شاهد مشاهده می شود به طوری که کاربرد نیتريت سدیم ۸۰ ppm و نمک ۰/۵ درصد مشابه کاربرد شاهد با نمک ۰/۳٪ در بازدارندگی از رشد و توكسين زايی کلستریديم بوتولینم تیپ A داشته است (نمودار ۶).

• به طور کلی ضمن آنکه هر دو تیمار نیتريت سدیم ۸۰ ppm و شاهد با نمک ۰/۳٪ کارایی بیشتری را در جلوگیری از رشد و توكسين زايی در مقایسه با نمک ۰/۵٪ نشان می‌دهند ولی این اثر در ارتباط با نیتريت سدیم ۸۰ ppm در مقایسه با شاهد بیشتر می باشد (نمودار ۷).

ب: نتایج حاصل از تزریق نمونه های کدر به موش

بعد از تزریق نمونه های تیمار حرارتی ۱۰۰ °C/۱۰' و حرارت ندیده هر یک از لوله های کدر به دو جفت موش که بر طبق دستورالعمل پیشنهادی USDA صورت گرفت، فقط موش هایی که به آنها نمونه های حرارت ندیده تزریق شده بود، در طی ۶-۲۴ ساعت علائم بوتولیتوکسین نظیر سیخ شدن موها، تنفس سخت، ضعف ماهیچه‌های پا، تنفس شکمی و بالاخره وقفه تنفس را نشان دادند. عدم مرگ موش ها در اثر تزریق نمونه های تیمار حرارتی بر خلاف نمونه‌های حرارت ندیده در مطالعات محققین به علت آن است که گروه های آزاد شیمیایی توكسين در اثر حرارت جوش غیرفعال شده اند. لذا در این مطالعه به موازات رشد باكتري (كدورت) توكسين زايی باكتري نیز تائید می‌گردد (جدول ۲) و روش ارزیابی زیستی بر روی موش Mouse Bioassay بر خلاف روشهای گران و سریع آزمایشگاهی نظیر (PCR، (Monoclonal)، (polymerase chain reaction)، (Antibody) MAB و (Enzyme linked Immuno Sorbant Assay) ELISA و ... به علت آنکه از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است، ارجحیت خاصی دارد (۱۲، ۲۶).

بحث

الف: هاگ‌زایی و شمارش

روشهای متفاوتی جهت هاگ‌زایی توسط محققین مختلف ارائه شده است که اساس و پایه کار همه یکسان است. در مطالعات رضویلر و همکاران (۱۳۸۰) از محیط کشت جامد EYA، در تحقیقات Anellis و همکاران (۱۹۷۲) از محیط کشت دوفازی و در تحقیقات Solmon و همکاران (۱۹۹۸) از محیط کشت chopped liver broth، cooked meat broth استفاده شد (۳، ۵، ۲۳).

محیط کشت جامد EYA بدلیل هاگ‌زایی در مدت زمان کوتاه تر و شمارش هاگ به میزان بیشتر، شناسایی راحت پرگنه‌های *Cl.botulinum* بر روی محیط کشت، پخش بوی نامطبوع به میزان کمتر، حمل و نقل آسان محیط های کشت در جاری هوازی، ایمنی بیشتر حین کار در آزمایشگاه

میزان تلقیح 4×10^4 cfu/ml در طی ۳۲ روز توانسته است از رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A جلوگیری به عمل آورد (جدول ۲).

تحقیقات Doyle, ME (۲۰۰۱) و Zhao, L و همکاران (۲۰۰۴) نشانگر عدم ژرمیناسیون یا رشد آهسته باکتری مزبور در شرایط چند فاکتوری در ۵/۵ pH می باشد (۱۰، ۲۷).

نمک طعام به عنوان یک نگهدارنده به خصوص در غلظت های بالا سبب جذب آب در مواد غذایی و پلاتوکسینولیز باکتری *Cl. botulinum* قبل از تقسیم سلولی می شود به طوریکه از طریق صدمه به غشا سلولی و نتیجتاً کاهش نفوذپذیری آن و همچنین عدم سنتز پروتئین و آنزیم های آنها سبب حساس شدن باکتری به سایر فاکتورهای محیطی و بالاخره وقفه رشد در آن می شود (۲۱).

در مطالعات KISS, I غلظت نمک ۰/۶٪ از رشد سویه های متفاوت این باکتری نظیر A۶۲ و A۳۳ و B۵۱ جلوگیری به عمل آورده است. همچنین در مطالعات Montvillae (۱۹۸۳) نیز مشابه بررسی کنونی کاهش pH به همراه غلظت نمک بالا (۰/۶٪) از رشد کلوستریدیوم بوتولینم سویه A۶۲ در طی ۳۰ روز جلوگیری نموده است (۱۶، ۱۹).

درجه حرارت رشد در این باکتری توسط ژن ویرولانس تنظیم می شود و حداقل و حداکثر درجه حرارت رشد *Cl. botulinum* تیپ A ذکر شده در منابع مختلف به ترتیب ۱۲-۱۰ و ۵۰-۴۸ و اپتیمم رشد آن ۳۵ گزارش شده است.

کاربرد حرارت پایین در این باکتری سبب کند شدن فعالیت ها و پایین آمدن سیالیت غشا و کاهش تبادل مواد از غشا باکتری می شود (۱۸، ۲۰). بر طبق بررسی های Schaffner (۱۹۹۸) نیز بین درجه حرارت و توکسین زایی باکتری ارتباط آنزیمی یافت شده به طوریکه در ۱۵ کمترین و در بیش از ۳۰ بیشترین احتمال رشد و توکسین زایی با تلقیح 10^4 هاگ باکتری سویه A۶۲ در ۵/۵ و ۵/۵ pH در طی ۹۳ روز گزارش شد (۲۳).

در مطالعات Braconier (۲۰۰۴) نیز با افزایش درجه حرارت، کاهش زمان رشد و توکسین زایی مشاهده شد؛ به طوریکه زمان توکسین زایی با افزایش دما از ۱۵ به ۳۰ درجه سانتیگراد، کاهش یافت (۸). علاوه بر درجه حرارت، زمان نیز به دلیل تأثیری که بر روی رشد باکتری دارد در تعیین سلامتی میکروبی و زمان ماندگاری غذا موثر است (۱۴).

در این مطالعه نیز یک رابطه سه سویه میان زمان، دما و سایر عوامل داخلی و خارجی در رشد توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A مشاهده شد. به نحوی که با افزایش دما از ۲۵ به ۳۵ درجه سانتیگراد زمان توکسین زایی کوتاه تر شده است (نمودارهای ۱ و ۳).

بر طبق مطالعات Elliot و همکاران (۲۰۰۱) مشابه مطالعه کنونی کاهش pH، افزایش نمک و کاهش درجه حرارت به طور تک تک و یا در ترکیب توام با هم سبب کاهش رشد و افزایش زمان تولید توکسین گشته است. (۱۱)

و بالاخره نیتريت سدیم که در محصولات گوشتی، آبزیان و پنیرهای خاص به عنوان نگهدارنده به کار برده می شود، می تواند از طریق اختلال در عمل آنزیم های آهن- گوگرددار باکتری نظیر فریدوکسین

و آسانی و راحتی کار در حین تهیه گسترش و رنگ آمیزی از نکات برجسته استفاده از محیط کشت جامد EYA در مقایسه با دو محیط کشت دو فازی و کشت مایع می باشد.

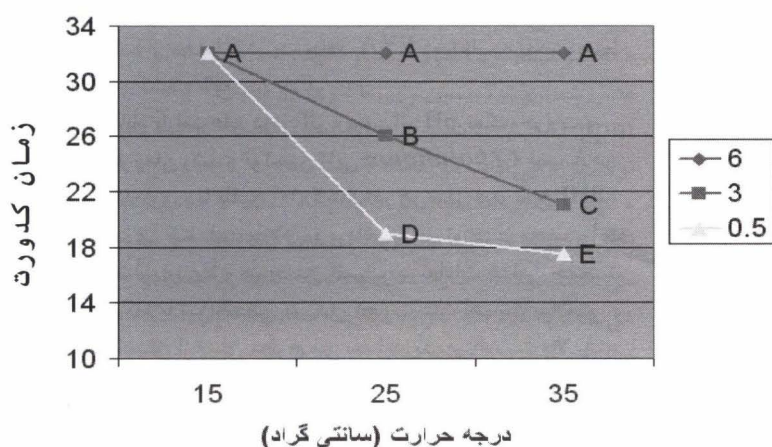
ب: تأثیر متقابل پارامترهای درون اثر و برون اثر pH، نمک، حرارت و نیتريت سدیم بر زمان رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A در طی ۳۲ روز نگهداری و با تلقیح 4×10^4 هاگ در هر میلی لیتر مایع BHI تغییر در الگوی کشاورزی (درو؛ برداشت و توزیع محصول)، تکنیک های فرآوری غذا و همچنین تغییر در عادات غذایی جمعیت رو به رشد همگام با بین المللی شدن تجارت غذا، اهمیت سلامتی و ایمنی غذا را بیش از پیش مطرح می سازد. بدیهی است بالا رفتن سطح دانش ما در زمینه فیزیولوژی و اکولوژی پاتوژن های غذا زاد از جمله باکتری *Cl. botulinum* می تواند در انجام مطالعات چالشی^{۱۰} تلقیحی در محیط کشت آزمایشگاهی و سپس غذا موثر واقع شده منجر به تسهیل برنامه تعیین آنالیز نقاط کنترل بحرانی^{۱۱} HACCP در صنعت غذا شود. پیشرفت های دو دهه اخیر مویید آن است که اعمال کاربرد فاکتورهای بازدارنده رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* نظیر pH، نمک، حرارت و نگهدارنده و ... به تنهایی سبب از بین رفتن خصوصیات ارگانولپتیک و خصوصیات تغذیه ای محصول غذایی می شود، لذا در اغلب مطالعات تلقیحی، از تداخل اثر متقابل پارامترهای درون اثر و برون اثر بر روی رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* استفاده می شود (۷، ۱۳، ۱۷، ۱۸، ۲۰).

در مطالعه حاضر همزمان پارامترهای مختلف نظیر pH (۵/۵ و ۵/۵) حرارت (۲۵، ۳۵ و ۱۵ درجه سانتیگراد) و نمک با غلظت (۰/۵ و ۰/۶) درصد و نیتريت سدیم ppm ۸۰ در طی ۳۲ روز در نگهداری بر روی رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A با میزان اینوکولوم 4×10^4 هاگ در هر میلی لیتر از محیط کشت BHI بررسی شده است و مشاهده شد که با میزان تلقیح مذکور در غلظت نمک ۰/۶، ۵/۵ pH و درجه حرارت ۱۵ سانتی گراد و نیتريت سدیم ppm ۸۰ هیچگونه رشد و توکسین زایی حاصل نشد از نظر تنظیم *Cl. botulinum* pH، ساختار خاصی ندارد و به شدت تحت تأثیر pH ماده غذایی قرار گیرد. pH در باکتری *Cl. botulinum* دارای یک حداقل، حداکثر و حد مطلوب می باشد. Sperber (۱۹۸۲) حد مطلوب pH رشد تیپ A یا B را ۸/۸۹-۸/۰۱ و Varnum (۱۹۹۱) این محدوده را جهت رشد پروتئولیتیک ها ۷-۶/۸ گزارش نموده، تعیین حد حداقل pH را در پروتئولیتیک ها پیچیده ذکر می نماید (۲۴، ۲۶).

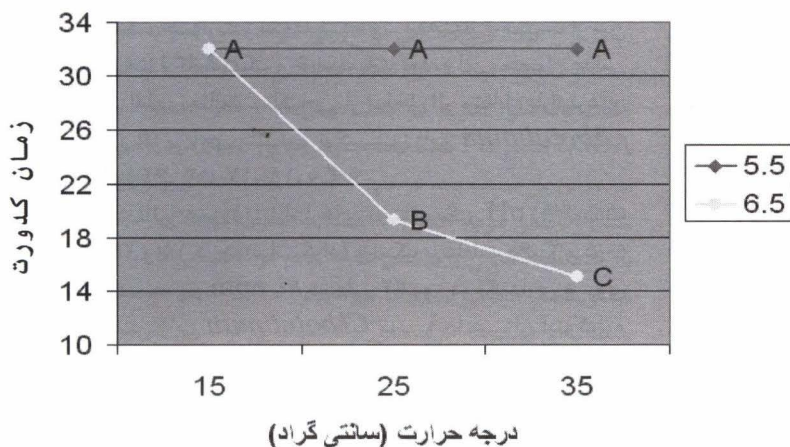
نامناسب بودن pH سبب مختل شدن فعالیت های آنزیمی و اختلال در انتقال مواد مغذی بداخل سلول باکتری شده، در نتیجه سبب عدم رشد باکتری می شود.

در پیشگیری از رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* عامل pH با سایر پارامترها نظیر aw، نمک، دما و پتانسیل اکسیداسیون و احیا و نگهدارنده و ... تداخل عمل دارد (۱۰، ۲۰، ۲۲).

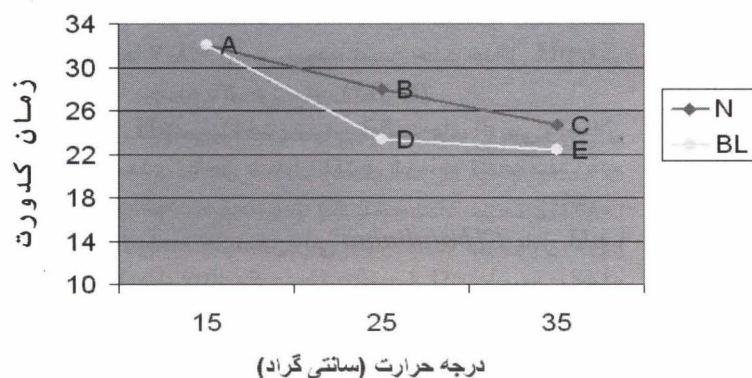
در مطالعه کنونی به نظر می رسد که سایر شرایط محیطی بازدارنده رشد *Cl. botulinum* تیپ A که در حد مطلوب نمی باشند می توانند سبب تغییر در میزان pH محدود کننده رشد شوند، به طوری که کاربرد توام نمک ۰/۶، درجه حرارت ۱۵ و ۵/۵ pH با



نمودار ۱- تاثیر متقابل حرارت (۳۵، ۲۵، ۱۵) درجه سانتی گراد و نمک (۶، ۳، ۰/۵) درصد بر روی رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A در طی ۳۲ روز و با میزان اینوکولوم 4×10^2 cfu/ml



نمودار ۲- تاثیر متقابل حرارت (۳۵، ۲۵، ۱۵) درجه سانتی گراد و PH (۶/۵، ۵/۵، ۴/۵) بر روی رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A در طی ۳۲ روز و با میزان اینوکولوم 4×10^2 cfu/ml



نمودار شماره ۳: تاثیر متقابل حرارت (۳۵ و ۲۵ و ۱۵) درجه سانتی گراد و نیتريت سدیم ۸۰ ppm و شاهد بر روی رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A در طی ۳۲ روز و با میزان اینوکولوم 4×10^2 cfu/ml

دهیدروژناز از ژرمیناسیون و اوت گرات (خروج از حالت اسپور) *Cl. botulinum* جلوگیری نماید، علاوه بر این خصوصیت ضد میکروبی به علت بهبود رنگ و طعم جهت عمل آوری گوشت به کار برده می شود.

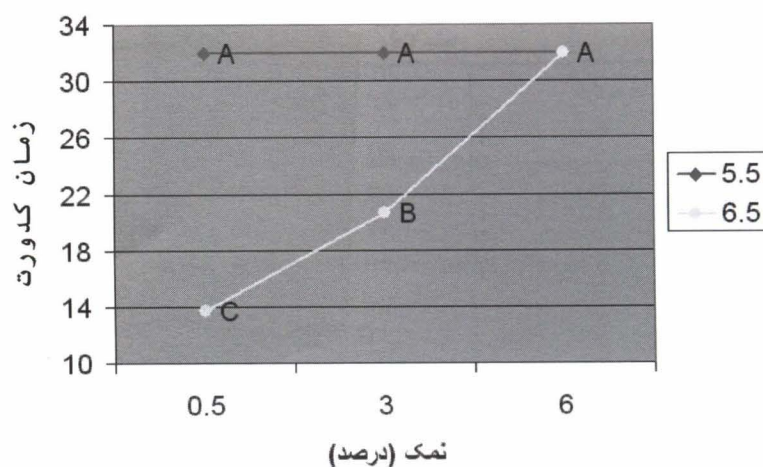
بر اساس نقطه نظرات کمیسیون اروپایی مرتبط با اثرات نیتريت و نیترات روی سلامتی میکروبی فرآورده های گوشتی (۲۰۰۴) مقدار نیتريت به کار برده شده در فرآورده های مختلف متفاوت بوده مقدار توصیه شده آن جهت جلوگیری از رشد کلستریدیم بوتولینم 100 mg/kg - ۵۰ و در فرآورده های کم نمک با عمر ماندگاری زیاد میزان آن 150 mg/kg - ۵۰ تعیین شده است (۴، ۹، ۲۱).

مطالعات مختلف نشانگر آن است که تاثیر بازدارندگی نیتريت سدیم از رشد *Cl. botulinum* پروتئولیتیک تا حدی زیادی به pH وابسته است، به طوریکه به ازای هر یک واحد کاهش pH خاصیت ضد میکروبی آن ده برابر افزایش می یابد. همچنین مقدار نیتريت سدیم جلوگیری کننده از رشد باکتری مزبور بستگی به تیمار حرارتی به کار رفته، aw، Eh، غلظت نمک و تعداد هاگ اولیه باکتری دارد (۷، ۲۰، ۲۶).

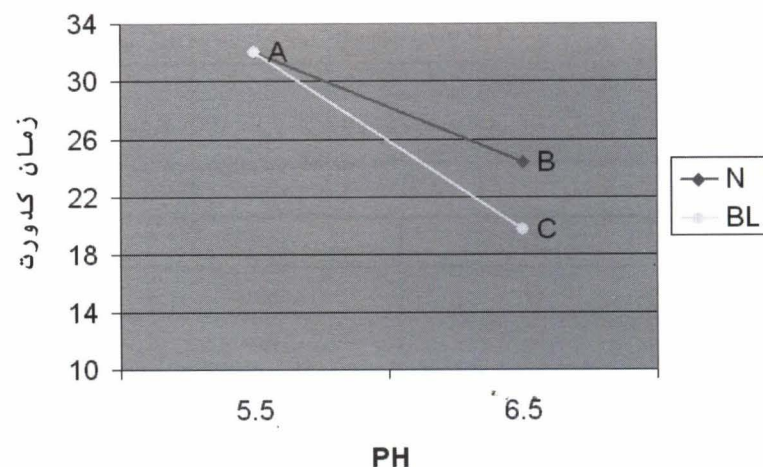
در این مطالعه نیز مقدار 80 ppm نیتريت سدیم در pH: ۵/۵، نمک ۶۶٪ و حرارت ۱۵ توانسته از رشد و توکسین زایی باکتری جلوگیری به عمل آورد. در همین مقدار نیتريت سدیم، pH: ۶/۵ و نمک ۳۶٪ و حرارت ۲۵ سانتی گراد در مقایسه با pH: ۶/۵ و نمک ۰/۵ درصد و حرارت ۳۵ سانتی گراد مدت زمان رشد و توکسین زایی را طولانی تر نموده است. اصولاً افزودن نیتريت سدیم به عنوان تیمار نگهدارنده به pH: ۶/۵، نمک (۳ و ۰/۵) درصد و حرارت های (۳۵ و ۲۵) درجه سانتیگراد، در مقایسه با تیمار شاهد خاصیت بازدارندگی بیشتری را اعمال نموده، در pH: ۶/۵، نمک ۳۶٪ و حرارت ۲۵ سانتی گراد مدت زمان رشد و توکسین زایی را بیشتر توانسته به تعویق بیندازد (نمودارهای ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و جداول ۱ و ۲).

در خاتمه با آنکه افزودن نیتريت سدیم 80 ppm (در مقایسه با تیمار شاهد) به عوامل چند فاکتوری نظیر pH: ۶/۵، نمک (۳ و ۰/۵) درصد و حرارت های (۳۵ و ۲۵) سانتی گراد توانسته است رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A را بیشتر به تعویق اندازد، ولی به دلیل تولید نیتروزآمین که در اثر ترکیب نیتريت با آمین های نوع دوم در غذا حاصل می شود و در مطالعات زیادی سخن از سرطان زایی آن رفته است، پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی از ترکیبات نگهدارنده دیگر به طور مستقل و یا توأم با مقادیر کم نیتريت سدیم در محیط کشت و سپس غذاهای در معرض خطر به منظور جلوگیری از رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* استفاده شود.

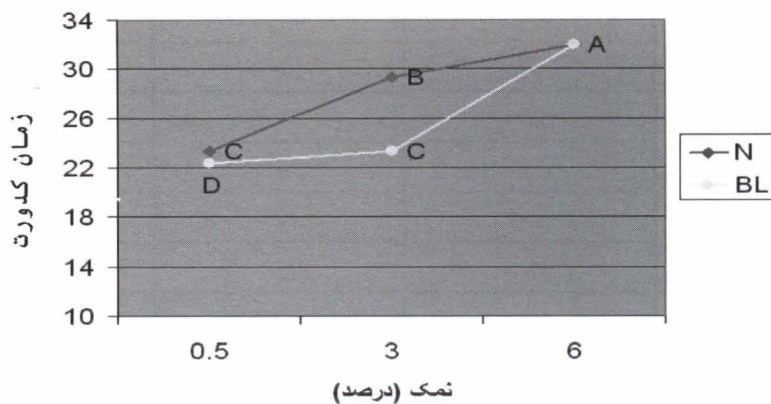
نمودار شماره ۴: تأثیر متقابل pH (۵/۵-۶/۵) و نمک (۰/۵ و ۳ و ۶)
درصد بر روی رشد و توکسین‌زایی *Cl.botulinum* تیپ A در طی
۳۲ روز و با میزان اینوکولوم 4×10^2 cfu/ml

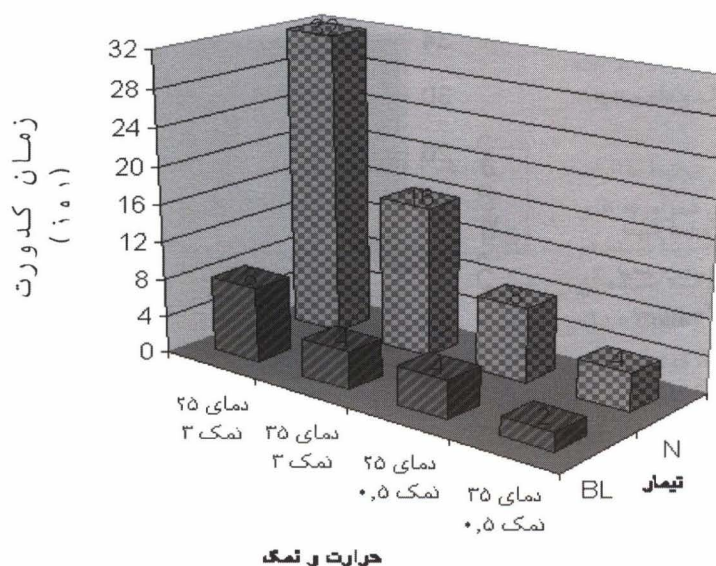


نمودار شماره ۵: تأثیر متقابل تیمار نیتريت سدیم ۸۰ ppm و شاهد pH
(۵/۵-۶/۵) بر روی رشد و توکسین‌زایی *Cl.botulinum* تیپ A در طی
۳۲ روز و با میزان اینوکولوم 4×10^2 cfu/ml



نمودار شماره ۶: تأثیر متقابل نیتريت سدیم ۸۰ ppm و شاهد و نمک (۰/۵ و ۳ و ۶)
درصد بر روی رشد و توکسین‌زایی *Cl.botulinum* تیپ A در طی
۳۲ روز و با میزان اینوکولوم 4×10^2 cfu/ml





نمودار شماره ۷: تأثیر متقابل تیمار نیتريت سدیم ۸۰ ppm و شاهد و pH: ۶/۵ و نمک (۳-۰/۵) و حرارت (۳۵ و ۲۵) سانتی گراد بر روی رشد و توکسین زایی *Cl. botulinum* تیپ A در طی ۳۲ روز و با میزان اینوکولوم 4×10^8 cfu/ml

جدول شماره ۱: جدول تجزیه واریانس صفت زمان کدر شدن با روش ANOVA متأثر از تغییرات pH، نیتريت سدیم، نمک، حرارت در طی ۳۲ روز در *Cl. botulinum* تیپ A با میزان اینوکولوم 4×10^8 cfu/ml

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع توان دومها (مجدورات)	میانگین مجدورات
درجه حرارت	۲	۱۸۷۲/۸۸	۹۳۶/۴۴
نمک	۲	۲۰۵۴/۲۲	۱۰۲۷/۱۱
pH	۱	۳۵۲۰/۴۴	۳۵۲۰/۴۴
درجه حرارت × نمک	۴	۱۱۳۲/۴۴	۲۸۳/۱۱
pH × درجه حرارت	۲	۱۸۷۲/۸۸	۹۳۶/۴۴
درجه حرارت × تیمار	۲	۱۳۰/۶۶	۶۵/۳۳
نمک × pH	۲	۲۰۵۴/۲۲	۱۰۲۷/۱۱
نمک × تیمار	۲	۲۴/۷۰۰	۱۲۴/۰۰
pH × تیمار	۱	۱۹۶/۰۰	۱۹۶/۰۰
درجه حرارت × نمک × pH	۴	۱۱۳۲/۴۴	۲۸۳/۱۱
درجه حرارت × نمک × تیمار	۴	۱۶۵/۳۳	۴۱/۳۳
درجه حرارت × pH × تیمار	۲	۱۳۰/۶۶	۶۵/۳۳
نمک × pH × تیمار	۲	۲۴۸/۰۰	۱۲۴/۰۰
درجه حرارت × نمک × pH × تیمار	۴	۱۶۵/۳۳	۴۱/۳۳
خطا	۱۰۸	۰	۰
جمع کل	۱۴۳	۱۵۱۱۹/۵۵	

جدول شماره ۲: زمان مشاهده رشد (کدورت) و توکسین‌زایی، تحت تاثیر تیمارهای مختلف حرارت نگهداری (سانتی گراد)

نمک، pH و نیتريت و شاهد در *Cl.botulinum* تیپ A با میزان اینوکولوم 4×10^7 cfu/ml در طی ۳۲ روز

درجه حرارت	نمک(%)	pH	شاهد (عدم نیتريت)		تیمار حرارت ندیده	تیمار حرارت دیده
			تیمار حرارت ندیده	تیمار حرارت دیده		
۱۵ درجه سانتی گراد	۰/۵	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	-	-	-	-
	۳	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	-	-	-	-
	۶	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	-	-	-	-
۲۵ درجه سانتی گراد	۰/۵	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	A (۴) D	A (۸) D	-	-
	۳	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	A (۳۲) D	A (۸) D	-	-
	۶	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	-	-	-	-
۳۵ درجه سانتی گراد	۰/۵	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	A (۴) D	A (۲) D	-	-
	۳	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	A (۱۶) D	A (۴) D	-	-
	۶	۵/۵	-	-	-	-
		۶/۵	-	-	-	-

D مرگ موش در اثر تزریق نمونه کدر حرارت ندیده با علامت بوتولیتوکسین

A عدم مرگ موش در اثر تزریق نمونه کدر حرارت دیده

() اعداد موجود در پرانتز نمایانگر روز کدورت (رشد) و توکسین‌زایی *Cl.botulinum* تیپ A می باشد.

منابع مورد استفاده

- ۱- ربیعی، مریم. (۱۳۷۷): بررسی فیتوشیمیایی برگ گیاه جینکو بیلوبا و تهیه فرآورده های آرایشی و بهداشتی از آن. پایان نامه دکترای داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، سال تحصیلی ۷۷-۷۶. پایان نامه ۳۷۹۶. صفحات ۶۲-۵۹.
- ۲- زرگری، علی. (۱۳۷۵): گیاهان دارویی. جلد چهارم، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۴۴۱-۴۴۷.
- ۳- مظفریان، ولی الله (۱۳۷۷): فرهنگ نام های گیاهان دارویی. چاپ دوم، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، اکثر صفحات.
- 4- Ahmed, W., A.Q., Khan and Malik, A. (1998): Two triterpens from the leaves of *Ficus carica*. Plant Med., 54, 481.
- 5- Asadi, F., Pourkabir, M., Maclaren, R. and Shahriari, A. (2006): Alteration to lipid parameters in response to Fig tree (*Ficus carica*) leaf extract in chicken liver

سپاسگزاری

از خانم رزیتا ارشدی جهت تایپ وزین مقاله تشکر می گردد.

پاورقی ها

- 1- Actiation
- 2- Initiation
- 3- Out growth
- 4- Vegetative
- 5- Minimum Lethal dose
- 6- Flaccid paralysis
- 7- (Merck.KGOA) این گاز یک قادر است بعد از ۱۵۰ دقیقه میزان اکسیژن را به صفر و میزان CO₂ را به ۱۸ درصد برساند.
- 8-United States Department of Agriculture
- 9- Intrarpevitonal
- 10- Inoculum pack study
- 11- Hazard anlysis and critical control point

- 22- Hemmatzadeh, F., Fatemi, A. and Amini, F. (2003): Therapeutic effect of fig tree latex on bovine papillomatosis. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. public health 50: 473-76.
- 23- Lee, M.K., Moon, S.S., Lee, S.E., Bok, S.H., Jeong, T.S., Park, Y.B. and Choi M.S. (2003): Naringenin, 7- α -cetyl ether as inhibitor of HMG-Co reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-feed rats 6:11(3):393-8.
- 24- Li, B.H., Max, F., Wang, Y. and Tian, W. (2005): Structure -activity relationship of polyphenol that inhibit fatty acid synthase. J. Biochem (Tokyo) 138:679-85.
- 25- Murray Robert, K., Granner Darly, K. and Rodwell Victor, W. (2006): Harper's illustrated biochemistry 27th ed. MacGrawHill-LANGE most of the pages.
- 26- Nakamara, Y., Susumu, I. and Yasuhide, T. (2000): Effect of quercetin and rutin on serum and hepatic lipid concentration feed steroid extraction and serum Antioxidant properties J. Health. Sci., 46:229-40.
- 27- Neri Bruce, P. and Frings Christopher, S. (1973): Improved method for determination of triglyceride in serum. Clin-Chem 19:1201-2.
- 28- Perez, C., Canal, J.R., Campillo, J.E., Romero, A. and Torres, M.D. (1999): Hypotriglyceridemic activity of *Ficus carica* leaves in experimental hypertriglyceridemic rats. Phyto. Res. B: 188-91.
- 29- Perez, C., Canal, J.R., Romero, A. and Torres, M.D. (1999): Experimental hypertriglyceridemia and hypercholesterolaemia in rats. Acta Physiol Hung. 86(1): 57-68.
- 30- Perez, C., Canal, J.R. and Torres, M.D. (2003): Experimental diabetes treated with *Ficus carica*: Effect on oxidative stress parameters. Acta Diabetol Mar: 40(1): 3-8.
- 31- Radostits Otto, M., Gayclive, C., Hincheliffkennethw, W. and Constable, Peter, D. (2007): Veterinary medicine 10th ed Saunder, pp: 50, 267, 324, 1427.
- 32- Reed Stephan, M., Bayly Warwick, M. and Sellon Debrac (2004): Equine internal medicine 2th ed Saunders, 979-81.
- 33- Rubnov, S.Y., Kashman, R., Rabinowitz, M., Schlesinger, M. and Mcchoulam, R. (2000): Suppressor of cancer cell proliferation from fig (*Ficus Carica*)resin isolation and structure elucidation. J. Nut. Prod 64,993-6.
- 34- Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, I.R. and Swayan, D.E. (2003): Disease of poultry. 11th ed. Blackwell publishing Company. pp: 1079-84.
- 35- Serraclara, A.F., Hawkins, C., Perez, C., Dominguez, E., Campillo, J.E. and Torres, M.D. (1998): Hypoglycemic action of an oral fig-leaf decoction. In type-1 diabetic patients Dia. Res. Cli. Pra, 39: 19-22.
- 36- Tabata, N., Ito, M., Tomodo, H. and Omura, S. (1997): Xanthohumols diacylglycerol acetyltransfrase inhibitor Homulus lupulus. Phytochemistry 46:683-87.
- 37- Yansi, s, Imaizumi, K. (1991): Effect of Indonesian medicinal plants *Curcuma xanthorrhiza* Roxb, on the level of serum glucose and triglyceride, fatty acid desaturation bile acid excretion in streptozocin-induced diabetic rats. Agr. Biol. Chem: 55 supp 12, 3005-3010.
- slices. Turk. J. Vet. Ani. Sci. 30: 315-318.
- 6- Bligh and Dyer (1959): Lipid extraction from media. Can. J. Biochem. Physio. 37:911.
- 7- Borradaile, N.M., deDreeu, L.E., Barrett, P.H., Behrsin, C.D. and Huff, M.W. (2003): Hepatocyte apoB- containing lipoprotein secretion is decreased by the grape fruit flavonoid, naringenin via inhibition of MTP-mediated microsomal triglyceride accumulation. Biochemistry 42: 1283-91.
- 8- Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utlising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 245.
- 9- Brunton, Laurence L. Lazo, John, Parker and Keith L. (2006): Goodman and Gillman, S. the Pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. McGraw hill. pp: 948-61.
- 10- Campillo, J.E., Torres, M.D., Dominguez, E., Romero, A. and Perez, C. (1994): *Ficus carica* Leaf administration reduces hypertriglyceridemia in streptozocin diabetic Rats. Diabetologia: 37 supp 1, A213.
- 11- Canal, J.R., Torres, M.D., Romero, A. and Perez, C. (2002). A chloroform extract obtained from a decoction of *Ficus carica* leaves, improve the chlosterolaemia of rats With streptozocin-induced diabetes. Act. Physio. Hung 87 71-76.
- 12- Casachi A., Maiyoh, G.K., Rubio, B.K., LI, R.W., Adeli, K. and Theriault, A.G. (2004): The Chalcone xanthohumol inhibit triglyceride and apolipoprotein B secretion in HepG2 cell. J. Nutr. 134:1340-6.
- 13- Cascchi A., Rubio, B.K., Maiyoh, G.K. and Theriault, A.G. (2004): Inhibitory activity of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and microsomal triglyceride Transfer protein (MTP) by the flavonoid, toxifolin, in HepG2 cell: Potential role in the regulation of apolipoprotein B secretion. Atherosclerosis 176:247-53.
- 14- Cianflone, K., Dahan, S., Monge, J.C. and Sniderman A.D. (1992): Phatogenesis of carbohydrate-induced hypertriglyceridemia using HepG2 cells as a model system. Arterioscler Thromb, 12:271-7.
- 15- Cignarella, A., Nastasi, M., Caralli, E. and Puglisi, L. (1996): Novel lipid-lowering properties of vaccinium mytillus L. leaves, atraditional antidiabetic treatment, in several model of rats dyslipidaemic: a comparison with ciprofibrate. Thromb Res Dec. 1:84 (5) 311-22.
- 16- Cook, N.C. and Samman, S. (1996): Flavonoid-chemistry-metabolism cardio protective effects and dietary sources. J. Nut., Biochem. 7:66-76.
- 17- De-Amorin. A.H., Borba, H.R., Carauta Lopes, D. and Kaplan, M.A. (1999): Anthelmintic activity of the latex of *Ficus carica*. J. Ethnopharm, 64: 255-258.
- 18- Evans, William Charles (2002): Trease and evana pharmacognosy 2002 15th ed. pp: 214-248.
- 19- Ettinger Stephenj (2005): Textbook of veterinary internal medicine disease of the Dog and cat. 6th ed Elsevier-Saunders, pp: 592-95, 1156-58.
- 20- Galati, E.M., Monforte, M.T., Forestieri, A.M., Miceli, N., Bader, A., Trorato, A. (1999): *Salvadora persica* L: Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemic in rat. phytomedicine, Jui: 6(3): 181-5.
- 21- Goldstein and Brown (1983): Lypid extraction from culthured HepG2 cells. Methods hn enzymology 98:241-261.