

GIDALARDA Clostridium Botulinum'un GELİŞMESİNE pH'NİN ETKİSİ

Yazan

K.A. ITO ve J.K. CHEN
National Food Processors
Association Berkeley

Çeviren

Dr. Daniş ÇAKMAK
Tarım ve Orman Bakanlığı
Gıda İşleri Genel Müdürlüğü

Genellikle kabul edilmiş gerçektir ki PH 4,6 veya daha düşük değerleri gıdalarda Clostridium botulinum'un gelişmesini engeller. Bu görüşü destekleyen veriler çeşitli araştırmaların yayınlarından sağlanmaktadır.

YAPILAN ÇALIŞMALAR

Dozler (1924), dana infuzyonu ile % 2 pepton-phosphate-buffered ortamında vegetatif hücre inoculumu kullanarak 37 şuşun ve spor inoculum kullanarak 19 şuşun gelişmesini sınırlayan PH değerlerini araştırdı. 0,1 ml inoculum stok suspansiyondan uygun PH'a ayarlanmış ortama ilave edildi. PH bir PH metre kullanılarak ölçüldü. 52 deneyin ortalamaları vegetatif hücre inoculası gelişme egrisini çizmede kullanıldı. Sonuçlar 4,87-8,89 sınırlarında PH 5,91-8,2 arasında optimum gösterdi, 23 deneyin ortalamaları spor inoculum gelişme egrisini çizmek için kullanıldı, sonuçlar 5,01-8,89 sınırlarıyla optimum PH 6,17-7,08 i gösterdi. Numünelerin tekrar sayısı, inoculum büyüklüğü, inoculasyonda kullanılan tipler ve şuşlar belirtilmemiştir.

Ingram ve Robinson (1951), üç tip A ve iki tip B şuşu ile inocule edilmiş tamponlu ekmek etsuyu ortamı kullandılar. Birçok tipler 10^3 - 10^4 spor/ml inocule edilmiş ve anarobic olarak 37°C ta inkulasyona bırakılmıştır. Bu ortamda PH 5,0 in altında gelişme olmamıştır. Inoculanın 10 serisinde bu durum gözlenmiştir, bir istisna olarak tip B şuşu PH 4,77-4,91 de gelişme göstermiştir. Gelişme sıvının Fildes Digest agarı üzerine yayılıp özel inkubasyon periyodundan sonra gelişen canlı organizmalar üzerinde tesbip edilmiştir.

Townsend ve Arkadaşları (1954), 14 değişik gıdayı tip A ve tip B spor suspansiyonu ile

inocule etmişlerdir, gerektiğinde homojeniteyi sağlamak için gıda karıştırılmıştır. İkinci tüpler 20-25 milyon sporla inocule edilmişlerdir. Incubasyon 30°C ta en az bir yıl sürmüştür. Gelişme tüplerde gaz teşekkülü ile tayin edilmiş toxin teşekkülü ile de teyid edilmiştir.

En yüksek PH seviyesindeki tüplerde ki bunlarda gaz teşekkülü görülmemiştir toksin varlığı kontrol edilmiştir. Gelişme zamanındaki PH inocule edilmemiş tüpler vasıtasıyla tayin edilmiştir. Çalışmanın sonuçları C. botulinum'un gelişmesini engelliyen minimum PH nın gıdadan gıdaya değiştiğini göstermiştir. En düşük PH da gelişme ananas pirinç pudinginde elde edilmiştir, burada gelişme PH 4,80 de vukubulmuş fakat PH 5,9 da engellenmiştir. En yüksek PH da gelişme PH 6,02 de muz puresinde olmuş ve PH 5,72 de gelişme engellenmiştir. Diğer mamullerde en düşük gelişme PH sı 4,93-5,44 arasındadır. Sebzelerde gelişme eğilimi daha düşük PH larda 4,86-5,20 çoğunlukla pH 4,9-5,0 tedir. Ananas pirinç pudingi hariç bu değer meyve ve mamullerinde pH 5,2-5,44 tür.

Tawnsend ve arkadaşlar (1954) sekiz tip A ve sekiz tip B şuşu üzerinde kültür ortamlarına detay çalışmaları da yapmışlardır. Gıdalardaki gibi kültür ortamlarında inocule ve incube edilerek incelenmiştir. Kültür ortamlarında pH nın engelleme seviyesi gıdalarinkinin üzerinde değildir. Kültür ortamında en az gelişme pH 4,98-5,02 olmuştur.

Ohye ve Christian (1966) Trypticase, maya ekstraktı, glucose ortamını çeşitli PH seviyelerine ayarlanmış olarak kullandılar. Onlar 10^3

* Food Technology June 1978 S. 71-74'den Çeviri

spor/ml yi 10 ml ortam ihtiva eden tüplere inocule ettiler. İki tip A, iki tip B ve iki tip E şuşu üzerinde çalıştılar. Gelişme gas formasyonu ve turbidite ile tayin edildi. Pozitif örneklerde toxisite testleri uygulandı. Onların sonuçları pH 5,0 ve 9,0 da gelişme olmadığını gösterdi.

Baird-Parker ve Freme (1967) tip A, tip B, ve tip E sporlarının tek şuşunu kullanarak modifiye edilmiş kuvvetlendirilmiş clostridial ortamda çeşitli pH ve su aktivitesi seviyelerine inoculasyon yaptılar. 2,5 ml ortam ihtiva eden deney tüplerine 10^7 - 10^8 spor/ml aşıladılar. Suspansiyonlar çeşitli sıcaklıklarda incubasyona tabi tutularak germination, gelişme ve vegetatif gelişmeleri kontrol edilmiştir. Onlar tip A sporlarının pH 5,0 da germinasyonunun olmadığını fakat pH 5,3 te germinasyon ve büyümenin vukubulduğunu, tip B sporlarının pH 5,0 te 20°C ta germinasyon göstermiş fakat büyümemiş olduğunu tesbit etmişlerdir. Mamafih pH 5,0 te 30°C ta tip B sporlar germinasyon ve üreme göstermişlerdir.

Hauschild ve Arkadaşları (1975) tip B sporlarının mantarlar üzerine 10^9 spor/kavanoz olacak şekilde direkt olarak inocule etti. 12 adet inocule edilmiş paralel kavanoz 30°C ta bütirik asit kokusu muayenesi için 10 hafta süreyle incubasyona tabi tutuldu. Kavanozlardaki mantarlardan bütirik asit kokusu gösterenler homojenize edilerek homojenat toxisite tayinleri için kullanıldı. Gelişme ve toksin teşekkülü pH $4,77 \pm 0,06$ da vukubuldu fakat pH $4,62 \pm 0,04$ te büyüme ve toxisite gözlenmedi. Aynı şekilde inocule edilmemiş mantarlarda pH $5,04 \pm 0,05$ te gelişme vukubuldu fakat pH $4,77 \pm 0,06$ da gelişme olmadı.

Tabiatta kontamine olmuş mantarların 100 gr mında 10 ile 214 C. botulinum sporu vardır. Buda tabii bulaşık kavanozların sadece 20 - 400 sporla inocule edildiğini gösterir.

Huhtanen ve Ark. (1976) 4 ml domates suyunu 4×10^3 spor inocule ettiler. Onlar bireysel olarak 6 tip A ve 4 tip B şuşunun gelişmesini incelediler. Gelişmenin görüldüğü en düşük pH 5,24 olarak tip B spor suspansiyonları için gözlemlendi.

SONUÇLAR BİRÇOK ETKEN TARAFINDAN ETKİLENMEKTEDİR.

Yukarıda özetlenen sonuçlar göstermektedir ki pH 4,6 Clostridium botulinum sporlarının engellenmesinde kullanılabilecek iyi bir genel kuraldır. (sınırdır). Bununla beraber, sonuçlar özel gıdaların gelişmenin önlenmesinde kendi minimum pH seviyeleri olduğunu vurgulamaktadır. Bu tayinlerde kullanılan test prosedürleri aynı değildir. Örneğin inoculum büyüklüğü değişiktir, denemelerde tekerrür 1'den 12'ye kadar değişmiştir. Çalışmalar mamuller, bakteriyolojik ortam ve her ikisinin karışımları üzerinde yapılmıştır. Görülmektedir ki deneysel sonuçların mukayesesi ve ortaya konulmasında bir örneklik yardımcı olacaktır. Aşağıdaki hususların sonuçlar üzerinde etkili olduğu görülmektedir.

● **Inokulum Büyüklüğü** : Herhangi bir gıdadaki gelişmenin vukubulacağı minimum pH yi etkilemektedir. Büyük inoculumlar gelişme için gerekli pH limitini düşürmektedir. Bunun delili Hauschild ve Ark. (1975) te görülmektedir ki burada 10^9 spor/kavanoz pH 4,77 de gelişme olabilmıştır. 20 - 400 spor/kavanoz ihtiva eden tabii inoculum da gelişme pH 5,04 te olabilmıştır. Fakat 4,77 de olmamıştır. Ho ve Ark. (1976) hıyar püresini 10^6 spor/tüp olarak inocule ettiler pH 5,0 de gelişme görüldü fakat pH 4,8 de görülmedi. 10^2 spor/tüp inoculumunda ise pH 5,15 te gelişme görüldü fakat pH 5,0 da gelişme görülmedi.

Segner ve Ark. (1966) ayarlanmış tripticase-pepton-glucose ortamını kullanarak tip E tüpünde pH 5,2 de 2×10^6 spor/tüp inoculumunda gelişme elde ettiler fakat aynı şuşun 10 misli inoculum seviyesinde, pH 5,03 te gelişme olmadı.

● **Kullanılan Şuşların Sayısı** : Bir gıdadaki gelişmenin olmaması için gerekli minimum pH ye etkiler. Ingram ve Robinson (1951) iki tip B şuşundan biri ekmek-etsuyu üzerinde pH 4,77 - 4,91 de geliştiğini fakat pH 4,49 da engellendiğini aynı şekilde diğeri için pH 5,01 - 5,19 da geliştiğini fakat pH 4,81 - 4,90 da engellendiğini göstermiştir. Üç tip A şuşundan biri pH 5,8 te gelişmiş fakat pH 5,5 ta engellenmiştir. diğeri pH 5,4 gelişmiş fakat pH 4,9 da engel-

lenmiştir sonuncusu ise pH 5,5 gelişmiş fakat pH 5,19 da engellenmiştir. Böylece bir şüşün asit tolerant olduğu tesbit edilmedikçe tek bir şüşle bir gıdada gelişme için gerekli minimum pH hakkında yeterli bilgi edinilemez.

• **Kullanılan Ortam** : Sonuçları etkilemektedir. Denemeler mamul, bakteriyolojik ortam ve mamulun bakteriyolojik ortamla kombine edilmiş şekli üzerinde yapılmıştır. Townsend ve Ark. (1954) bir bakteriyolojik ortamda gelişme için gerekli minimum pH kullanılan bakteriyolojik ortama bağlıdır. Yedi tip B şüşünün karışımını kullanarak Yesair's domuz infozyon et-suyunda pH 4,98 de gelişme ve toksin teşekkülü elde ettiler, Wheaton's beef-casein broth üzerinde pH 5,22 de gelişme elde ettiler. Yedi tip A şüşün karışımını kullanarak Yesair's pork infusion broth'da pH 4,98 de gelişme ve toxin teşekkülü elde ettiler fakat aynı sonuçları Wheaton's beef heart-casein broth üzerinde sadece pH 5,09 da elde ettiler, İlaveten onların çalışmaları gelişme için gerekli minimum pH nin mamulden mamule değiştiğini göstermiştir.

• **Numunelerde Kullanılan Tekerrür değişmektedir** Büyük inokulumlarda örneklerin tekerrürü az önemlidir çünkü düşük bir pH da gelişebilecek spor bulunması ihtimali yüksektir. Bununla beraber küçük veya orta büyüklükteki inokulumun seviyelerinde numunelerde tekerrür sayısı en düşük pH ta gelişmeyi elde etmede önemli rol oynayabilir. Bu, verilen ortama daha fazla sporun isabet etmesi gelişme için daha uygun çevre ve şans temin edebilir, ve verilen herhangi bir pH seviyesinde pozitif tekerrürleri gözlemek suretiyle herhangi bir ürünün düşük pH seviyesinde gelişimi destekleme potansiyelini tayine fırsat vermesinden dolayıdır.

• **Inkubasyon Sıcaklığı** : Sporların çimlenmesini ve gelişmesini etkiler. Baird-Parker ve Fleame (1967) tip A ve tip B şüşleri ile çalıştılar ve 30°C ta gelişmeyi 20°C takinden daha düşük pH değerinde elde ettiler. Onlar, Segner ve arkadaşlarının (1966) tip E organizmaları üzerinde 30°C ta, daha düşük sıcaklıklardaki inkubasyonlardan daha düşük pH değerlerinde gelişme olduğu sonucunu, tey'd ettiler. Belirtilen araştırmalarda inkubasyon sıcaklığı 20 - 37 °C arasındadır.

• **Gelişmenin kriterleri** : Bir minimum pH da gerçek bir subkültürde bulunan organizmaların sayısının tesbiti, gaz teşekkülü ve müteakiben bunun toksin bulunması ile teydidir. Çalışmaların çoğu bilinen inokule ürünler üzerinden yapıldığından teyid gerekli olmayabilir. Maffei Kautter (1976) en düşük gelişme pH sında çok az gaz bulunabileceğini belirtmiştir. Bundan dolayı sadece gaz teşekkülü kriter olarak kullanılırsa hatalar olabilir.

TAVSİYE EDİLEN UNIFORM TEST PROSEDÜRÜ

Bir gıdadaki *C. botulinum* sporlarının gelişebileceği minimum pH seviyesini tayin etmek için ihtimalleri optimize etmede aşağıdaki protokolu dikkate alınmasını teklif ederiz.

1 — Inoculumun büyüklüğü olagan dışı durumlarında dikkate olacak şekilde tabii kontaminasyon seviyesini temsil etmelidir. 10⁴ spor/kablik inokulum uygun olacaktır.

2 — Makul sayıda tipler ve şüşler kullanılmalıdır. Birçok ürün için pH ya karşı şüş hassasiyeti bakımından tip A ve B olmalıdır. Biz herbir tipten 3-5 şüşün kullanılmasını tavsiye ederiz.

3 — Denenen ürün bakteriyolojik bir ortamdan ziyade bir gıda olmalıdır, veya bakteriyolojik ortamla takviye edilmiş bir gıda olmalıdır.

4 — Ürün herhangi bir pH seviyesinde 5-10 tekerrür olarak deney tüpüne veya herhangi bir diğer kaba konarak denenmelidir.

5 — Ürün 30°C ta anaerobik olarak inkubasyona tabi tutulmalıdır. Eğer thioğlicolate kullanılıyorsa dikkat edilmelidir çünkü minimum pH seviyesinde çok yüksek konsantrasyonda kullanıldığı zaman gelişmeyi önleyici veya engelleyici etkileri görülmektedir (Segner ve Ark. 1966).

6 — Gelişme mikroskopik olarak veya gaz teşekkülü ile gözlemlendiğinde minimum pH seviyesinde toksin varlığı tesbit edilmelidir. Ayrıca enazından daha düşük olan diğer bir pH seviyesi gelişme ve toksin bakımından incelenmelidir. Tripsin uygulaması optimum toksin teşekkülünde faydalı olabilir.

ASİTLİ GIDALARDA BOTULİSMİN İZAHI

Bu çalışmalarla pH 4,6 da *C. botulinum*'un gelişmesinin engellendiğinin belirtilmesine rağmen zaman zaman evlerde hazırlanmış asitli gıdalarda botulizm vukubulmaktadır. Hastalık kontrol Merkezi (CDC 1973) Kentucky'de 1973 yılında iki botulizm vakasını rapor etmiştir. Araştırmalar gösterdiği evde yapılmış ve kutulanmış böğürtlen konservesi hastalıktan kısa bir süre önce tüketilmiştir. Böğürtlenlerde *C. botulinum* tip B bulunmuştur fakat toksin tesbit edilmemiştir. Hastanın birinde yapılan dışkı ve kan analizinde toksin bulunmuştur. *C. botulinum* vegetatif hücrelerinin canlı ortamda toksin meydana getirme kabiliyetleri tartışılmıştır.

1974 te Alabama'da bir botulizm vakası olmuştur (CDC 1974 a) Araştırmalar hastalıktan önce evde yapılmış domates konservesi tüketildiğini göstermiştir. Hastanın dışkısı Clostridium tip B bakımından pozitif. Konserveler kavanozu atılmıştı diğer kavanozlar kontrol edildi ve *C. botulinum* ve botilinal toxin bakımından negatif. Kavanozlardaki ürünün pH sı 4,5 idi.

Gene 1974 te Idaho'da bir botulizm vakası oldu (CDC, 1974) Araştırmalar hastalıktan önce evde yapılmış ve konsere edilmiş domates suyunun tüketildiğini göstermektedir. *C. botulinum* tip A toksini hastanın kanında tesbit edilmiştir ve tip A organizmaları dışkısından izole edilmiştir. Kullanılan domates suyu tip A toksini ve *C. botulinum* tip A ile birlikte diğer organizmalarla ihtiva etmekteydi. Domates suyunun pH sı 4,2 idi.

Prokhorovich ve Ark. (1976) laboratuvar çalışmalarında bir tip A ve bir tip B şuşu ile 3×10^6 spor/ml seviyesinde şeftali suyu ve kompostosunu inoküle ettiler çalışmalar gösterdik pH 4,5 ve kullandıkları sterilizasyon tekniği spor germinasyonu ve toksin teşekkülünü önlemeye yeterli değildi.

Bu raporlar *C. botulinum*'un gelişmesini pH 4,6 nun engelleme kabiliyeti hakkında şüphe tekin etmektedir. Bununla beraber Baird-Parker ve Freame (1967) nin verileri pH 4,6 veya daha düşük değerlerde gelişme ve toksin teşekkülü ihtimalinin çok düşük olduğunu göstermektedir. Onların sonuçları göstermektedir ki herne kadar tip A ve E pH 5,0 te spor germinasyonu olabılırsede spor gelişmesi vukubulmamaktadır.

Onlar tip B sporlarının pH 5,0 da 30°C ta inokube edildikleri zaman germinasyonun olduğunu fakat 20°C ta inkubasyonda germinasyonun olmadığını bulmuşlardır. Daha düşük pH dereceleri üzerinde çalışmamışlardır.

Rowley ve Feehery (1970) *C. botulinum* 62 A nin germinasyonunu etkileyen şartları tesbit etmiştir. 10^8 spor/ml inokulum seviyesinde kullandıkları L, cussysteine germinasyon sisteminde maximum germinasyon pH 6,5 - 7,5 olmuş pH 4,8 altında germinasyon olmamıştır. Wunne ve Ark. (1954) bir tip A ve bir tip B nin tamponlu glukoz ortamında germinasyonu üzerinde çalıştılar. 10^3 - 10^4 spor/ml inokulum seviyesi kullanarak pH 7,de germinasyon olduğunu fakat pH 4,8 de olmadığını buldular. Eğer germinasyon olmasa gelişme ve sonraki çoğalma ve toksin teşekkülü olamaz. Hatta germinasyon olsa bile müteakip gelişmelerin olacağı garantili değildir.

Asit gıdalarda *C. botulinum* için buna benzer bir açıklamada Huhtane ve Ark. (1976) çalışmalarında bulunmaktadır. Onlar domates suyuna *C. botulinum* sporları yanında küfleride aşılamışlardır. Onlar *C. botulinum* sporlarının minimum gelişme pH sınını 5,24 olarak bulmuşlardır. Mamafih küflere birlikte *C. botulinum* sporlarının inokule edildiği domates suyu başlangıç pH sı olarak 4,2 de toksik hale gelmiştir. Inokule edilmiş ortamın pH değerini başlangıçtan 8,2 ye kadar ölçmüşlerdir. En yüksek pH değerleri küf tabakasının altında elde edilmiştir. Buda göstermektedirki uygun şekilde hazırlanmış asit gıdalardaki normal olarak bulunmayan rakip mikroorganizmalar başlangıçta gelişebilir ve çevreyi *C. botulinum* sporlarının gelişmesini destekleyici şartlara dönüştürebilirler.

Böylece bu asit gıdalardaki gelişme pH 4,6 veya daha düşük asidik şartlardaki gıdada *C. botulinum*'un gelişme kabiliyetinden değil fakat daha ziyade pH nin diğer mikroorganizmaların faaliyetleri nedeni ile engelleme seviyesinin üzerine yükselmesinden dolayıdır.

ENGELLEYİCİ pH GIDALARA GÖRE DEĞİŞİR

Gıdalardaki *C. botulinum*'un gelişmesi üzerine pH etkisiyle ilgili literatürü gözden geçi-

rilmesi göstermiştir ki her ne kadar 4,6 lik bir pH C. botulinum sporlarının gelişmesini engellersede engelleme nin vukubulduğu gerçek pH herhangi bir gıda için özeldir ve pH 4,6 dan büyük

olabilir, gene göstermiştir ki bu makalede teklif edildiği gibi bir test prosedürü gelecekteki çalışmaların sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Baird - Parker, A.C. and Freame, B. 1967. Combined effects of water activity, pH and temperature on the growth of Clostridium botulinum from spore and vegetative cell inocule. J. Appl. Bacteriol. 30 : 420.
- CDC. 1973 Botulism - Kentucky. Center for disease Control Morbidity and Mortality Weekly Report 22 (50) : 417
- CDC. 1974 a. Botulism - Alabama, Center for Disease Control Morbidity and Mortality Weekly Report 23 (10) : 90.
- CDC. 1974 b. Botulism - Idaho, Utah. Center for Disease Control Morbidity and Mortality Weekly Report 23 (27) : 241.
- Dozier, C.C. 1924. Optimum and limiting hydrogen - ion concentrations for C. botulinum and quantitative extinction of its growth. XVI. J. Infect. Dis 35 : 105.
- Hauschild, A.H.W. Arsi B.J. and Hilsheimer, R. 1975. Clostridium botulinum in marinated products Can. Inst. Food Sci. Technol J. 8 : 84.
- Huhtanen, C.N. Naghski, J. Custer C.S. and Russell, R.W. 1976. Growth and toxin production by Clostridium botulinum in moldy tomato juice. Appl. Environ. Microbiol. 32:711.
- Ingram, D.M. and Robinson R.H.M. 1951. The growth of Clostridium botulinum in acid bread media. Proc. Soc Appl Bacteriol. 14 : 62.
- Ito, K.A., Chen I.K., Lerke, P.A., Seeger M.L., and Unverferth J.A. 1976. Effect of acid and salt concentration in fresh - pack pickles on the growth of Clostridium botulinum spores. Appl. Environ. Microbiol. 32 : 121.
- Kautter, D.A. 1976. Personal communication. Food and Drug Admin Washington D.C.
- Ohye D.F. and Christian J.H.B. 1966. Combined effects of temperature, pH and water activity on growth and toxin production by Cl. botulinum types.
- A.B and E. In «Botulism 1966» Proc. 5 th Intl. Symp Food Microbiol, Moscow, p 217 Chapman and Hall Ltd, London.
- Prokhorovich L.E. Saltykova, L.A., Shenderovskaya, L.M. Gritsko, L.P. and Klepa, N.F. 1976. Possibility of development of Clostridium botulinum in apricot juice and compote Konservnaya I Ovoshchesushil 'naya Promyshlennost' 1 : 35.
- Rowley, D.B. and Feeherry F. 1970. Conditions affecting germination of Clostridium botulinum 62A spores in a chemically defined medium J. Bacteriol. 104 : 1151.
- Segner W.P. Schmidt, C.F. and Boltz, J.K. 1966. Effect of sodium chloride and pH on the outgrowth of spores of type E Clostridium botulinum at optimal and suboptimal temperatures. Appl. Microbiol 14 : 49.
- Townsend, C.T. Yee, L. and Mercer W.A. 1954. Inhibition of the growth of Clostridium botulinum by acidification. Food Res. 19 : 536.
- Wynne, E.S. Mehl, D.A. and Schmieding, W.R. 1954. Germination of Clostridium spores in buffered glucose J. Bacteriol 67 : 435.

Helâl Süt-Yonca Süt