مطالعه توان رشد و سم زایی کلستریدیم بوتولینم «تیپ A» متأثر از تغییرات pH ، نمک، حرارت و زمان نگهداری در محیط مدل B.H.I

دکتر زهره مشاک *[۱]؛دکتر ودود رضویلر[۲]

چکیده

در این مطالعه ، توان رشد و سم زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A با تداخل اثر متقابل عوامل درون اثر و برون اثر، به صورت طرح فاکتوریل، متأثر از مقادیر مختلف pH، نمک، حرارت و زمان نگهداری مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج حاصله در قالب طرح کاملاً تصادفی و تست ANOVA و تجزیهٔ واریانسِ صفت زمان کدرشدن (Time to turbidity) و صفت زمان سم زایی(Time to toxicity) در برنامهٔ کامپیوتری SAS ارائه گردیده است. این مطالعه در طی سه مرحله : اسپورزایی؛ تداخل اثر متقابل عوامل چند فاکتوری ؛ و سپس تعیین وجود سم در موش؛ صورت پذیرفت.

در مرحلهٔ اول پس از سه بار کشت و پاساژ متوالی باکتری کلستریدیم بوتولینم تیپ A تهیه شده از دانشگاه دیویس کالیفرنیا و انتقال آن به محیط کشت جامد Egg Yolk Agar(EYA) و Brain Heart Infusion Agar (BHI) به صورت کشت پُر و سطحی در شرایط بی‌هوازی و گرمخانه‌گذاری در ۳۵°C، اسپورزایی از روز چهارم شروع شده و با مشاهدات روزانه ویدیو میکروسکوپی از طریق تهیه لام مرطوب و گسترش رنگ‌آمیزی اسپور با مالاشیت گرین تا روز پانزدهم یعنی تا زمانی که حداکثر اسپورزایی (بیش از ۹۰٪ در یک شان میکروسکوپی) حاصل گشت ادامه داشت.سپس اسپورها تحت شرایط آسپتیک و طی ۵ بار رقیق سازی با ژل فسفات بافر و سانتریفوژ یخچال‌دار ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ دور در ٤°C طی ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. و در خاتمه شمارش اسپور در یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل شد.در مرحلهٔ دوم مدت زمان جهت رشد و مشاهدهٔ کدورت با میزان تلقیح ٤×۱۰^٤ اسپور در هر میلی‌لیتر از محیط آبگوشت BHI در داخل لولهٔ آزمایش به ترتیب با دو میزان pH(۵/۵ و ٦/۵) : سه غلظت نمک (۰/۵ و ۳ و ٦) درصد و سه میزان حرارت (۱۵ و ۲۵ و ۳۵) درجه سانتیگراد در طی ۳۲ روز (روزهای۲ و ٤ و ۸ و ۱٦ و ۳۲) مورد مطالعه قرار گرفت و نمونه‌های کدر در روزهای مزبور از گرمخانه خارج گردیدند و با استفاده از تهیه گسترش رنگ‌آمیزی و همچنین کشت خطی از لوله‌های کدر به پلیتهای EYA، رشد باکتری تأئید شد.در مرحلهٔ سوم به روش زیست سنجی و بر طبق دستورالعمل USDA، آزمایشات تعیین سم نمونه های کدر در موش انجام شد. نتایج نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار در بین مقادیر متفاوت حرارت، نمک و pH ، در طی زمانهای کدورت بود (P< ۰/۰۰۱). کاربرد متقابل غلظت نمک ٦٪ pH=۵/۵ و حرارت ۱۵°C در طی ۳۲ روز نگهداری با تلقیح ٤×۱۰^٤ باکتری کلستریدیم بوتولینم تیپ A در جلوگیری از رشد و سم زایی آن تأثیر قطعی داشت. کاربرد نمک ۳ درصد در مقایسه با ۰/۵ درصد و همچنین حرارت ۲۵°C در مقایسه با ۳۵°C اثر بازدارندگی بیشتری در جلوگیری از رشد و سم‌زایی با کتری مزبور در pH:٦/۵ و در طی ۳۲ روز نگهداری داشت و بالاخره یک اثر جایگزینی بین حرارت و نمک مشاهده شد به طوریکه کاربرد حرارت ۲۵°C و نمک ۰/۵ درصد اثر مشابهی در بازدارندگی از رشد و سم‌زایی باکتری کلستریدیم بوتولینم تیپ A در مقایسه با حرارت ۳۵°C و نمک ۳ درصد بود.

واژه های کلیدی *: کلستریدیوم بوتولینم تیپ A، اسپورزایی ، زمان کدر شدن، زمان سم زایی*

The Survey of growth and toxigenesis of Clostridium botulinum type A under the effect of multivarient pH, salt, temperature and time of storage in B.H.I model

Mashak.Z[1*],Razavilar.V[2]

1-Postgraduated of food hygiene ,Faculty of specialized veterinary sciences,Islamic azad university,Science &Research Campus,Tehran,Iran

2-Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, Tehran university,Tehran,Iran

In this study, growth (visible turbidity) and toxigenesis of Clostridium botulinum type A with the size level of inoculum 4×10^4 cfu/ml was surveyed with interference of Intrinsic and extrinsic parameters, such as pH, salt, temperature and storage time in B.H.I broth and results evaluated with completely randomized, ANOVA, in SAS system.So, this survey was performed during three steps. The fist step was sporogenesis of bacteria in agar media (EYA , BHI). After three consecutive passages of lyophilized bacteria (provided from University of California Davis), under anaerobic conditions, transferred to (EYA,BHI) agar. Sporogenesis started from 4th day till 15th day, that maximum free spores were observed (More than %90) using of continuing wet lam and Malaschite Green staining , through video microscope, every day.Then the colonies of plates were washed aseptically, separately and gathered with phosphate buffer gell dilutor and cold centrifuged 5000-10000/min. At last spore count got in one mililiter of suspension. In the second step, the effect of multifactorial parameter combination such as pH (5.5 and 6.5); salt concentration (0.5, 3 , 6%), temperature (15 , 25 , 35°C) and storage time (2,4,8,16,32 days) in anaerobic condition with inoculom size level 4×10^4 spore/ml were cultured in to the B.H.I broth, for the time of turbidity and toxigenesis.In the third step, toxigenesis confirmed with USDA instruction and mouse bioassay injection. The growth and toxigenesis concluded a shorter period of time in 35°C in contrast with 25°C and in %0.5 with %3 salts cocentration. Also in growth and toigenesis of bacteria observed a substitional effect between salt and temprature (25°C and %0.5 salt with 35°C and %3salt)The results of present study reveals the salt : (%6) pH : (5.5) and temperature : (15°C) with the inoculum level (4×10^4 cfu/ml)inhibits the growth and toxigenesis of Clostridium botulinum type A in contrast with salt (0.5 and 3)% , pH: 6.5 and temperature (25 and 35)°C in 32 days.

Key words: *Clostridium botulinum type A, Sporogenesis, Time to turbidity , Time to toxicity*

*۱- دانش آموخته دکترای تخصصی بهداشت مواد غذائی؛دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی؛دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات ؛تهران؛ایران

۲- گروه بهداشت مواد غذائی ؛ دانشکده دامپزشکی ؛دانشگاه تهران؛ تهران ؛ ایران

مقدمه

باکتری کلستریدیم بوتولیسم از خانوادهٔ باسیلاسه، جنس کلستریدیا و گونهٔ کلستریدیوم بوتولینم می باشد. انواع این گونه گرم مثبت، بی‌هوازی اجباری و اسپوردار است که اسپور آن نزدیک به انتهایی بوده و در محل استقرار خود متورم می‌باشد و برحسب واکنشهای شیمیایی به دو فرم پروتئولیتیک و غیرپروتئولیتیک تقسیم می گردند. بر اساس بررسیهای سرولوژیک ۷ تیپ از این گونه (A تا G) تشخیص داده شده‌اند که با وجود اثرات و خصوصیات ساختاری و فارماکولوژیکی مشابه بر روی میزبان، از لحاظ آنتی ژنیکی متفاوت می‌باشند.

شرایط محیطی مطلوب رشد باکتری کلستریدیوم بوتولینم تیپ A عبارت است از حرارت $35^{o}C$ ، نمک کمتر از ۱۰٪ ، aw : ۰/۹٤ ؛ pH : ٦/۸-۷ ؛ Eh : - ۳۵۰mvC و بالاخره رشد در شرایط بی‌هوازی.

باکتری کلستریدیوم بوتولینم تیپ A، یکی از اعضاء خانواده باسیلاسه بوده که از سهولت انتشار و گستردگی پاتوجغرافیایی خاصی برخوردار می‌باشدبه نحوی که اسپورباکتری به فراوانی در خاک، آب، رسوبات دریایی، دستگاه گوارش حیوانات و ... یافت می‌شود و بدین ترتیب می‌تواند به اغذیه خام گیاهی و حیوانی منتقل و در اثر فرایند و یا سایر شرایط محیطی مساعد در غذا باقی مانده، رشد و توکسین تولید نماید (۲٦،۲٤،۲۲،۱۸،۸).

در قرن حاضر و همگام با ظهور تجارت بین‌المللی غذا؛ پیشرفت علم و تکنولوژی صنعتی و کشاورزی در امر فرآوری، بسته بندی، نگهداری، توزیع ومصرف غذاهای متنوع با فرمولاسیون و اجزاء متشکله پیچیده؛ خطر بروز بسیاری از میکروارگانیسم های بیماری‌زا غذازاد و از جمله بوتولیسم را بیش از پیش مطرح نموده است.

خطر مسمومیت و همچنین کشندگی بالای این باکتری، در مقایسه با سایر پاتوژنهای غذازاد از اهمیت بیشتری برخوردار است. زیرا توکسین حاصل از آن یکی از قوی‌ترین و خطرناکترین سموم شناخته شده در دنیا محسوب می‌شود بطوری که دوز کشنده آن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ۵۰٪ از یک جمعیت انسانی به میزان یک نانوگرم گزارش شده است(۲٦،۱۸،۸،۷).

قابل ذکر آنکه باکتری مزبور در انواع حیوانات و انسان ایجاد بیماری می‌نماید و در انسان فرم غذایی آن در مقایسه با اشکال دیگر نظیر بوتولیسم نوزادان و بوتولیسم زخمی و بوتولیسم با منبع ناشناخته بیشتر شایع می‌باشد و عمدهٔ موارد مسمومیت غذایی بوتولیسمی ناشی از تیپ A(پروتئولیتیک گروه I) و سپس تیپ E (غیرپروتئولیتیک گروه II) می‌باشد. این مسمومیت غذایی به صورت intoxication و بدنبال خوردن توکسین مترشحه ناشی از رشد باکتری در غذا حادث می‌شود که در نتیجه آن نوروتوکسین به سیستم عصبی فرد حمله نموده با جلوگیری از ترشح استیل کولین در محل اتصال عصب – ماهیچه مانع انتقال پیام عصبی و نتیجتاً فلجی شل در عضلات می‌گردد. از دیگر علائم بیماری می‌توان به خستگی عمومی، ضعف ماهیچه، سرگیجه، تاری دید، اشکال در عمل بلع و تکلم ، فلج عضلات، اختلال تنفس و سرانجام وقفه تنفسی و مرگ اشاره نمود. (۲۷،۱۸،۹،۸،۷،۲،۱)

لذا با توجه به اهمیت و ابعاد مختلف اقتصادی، اجتماعی و سیاسی بوتولیسم، که خطری جدی جهت سلامتی غذا و ازهمه مهمتر جان انسانها می‌باشد، لزوم کاربرد ابزارهای خاص کنترلی رشد و توکسین‌زایی باکتری در غذا ضروری به نظر می‌رسد.

شناسایی خصوصیات خاص فیزیولوژیک و اکولوژیک باکتری خصوصاً اسپورزایی و همچنین تبدیل اسپور به فرم رویشی که در طی سه مرحله فعال‌سازی (Activation)، جوانه‌زنی (Germination) و مرحلهٔ خروج (Out growth) و سپس رشد و تکثیر باکتری رویشی (Vegetative) و ترشح توکسین صورت می‌پذیرد از

اهمیت برجسته‌ای در کنترل و پیشگیری از بوتولیسم در مواد غذایی برخوردار است.

مطالعات نشانگر آن است که جلوگیری از رشد و توکسین زایی باکتری کلستریدیوم بوتولینم تحت شرایط محیطی مختلفی نظیر pH، حرارت، نمک، مواد نگهدارنده و غیره صورت می‌پذیرد. و چون اعمال کاربرد هر یک از شرایط محیطی بازدارنده رشد باکتری به تنهایی، سبب از بین بردن یا کاهش ارزش تغذیه‌ای و یا ویژگهای ارگانولپتیک ماده غذایی می‌شود؛ از سوی دیگر نیز وجود ریزمغذی‌ها و فرمولاسیون متفاوت موجود در انواع غذاها به صورت ترکیبی در بازدارندگی از رشد باکتری عمل می‌نمایند؛ لذا جهت رفع این نقیصه از تأثیر متقابل عوامل درون اثر Intrinsic factors و برون اثر Extrinsic factors در قالب مطالعات چالشی تلقیحی در محیط کشت آزمایشگاهی و سپس مادهٔ غذایی استفاده می‌شود. که خود گام مهمی در تأمین سلامتی و ایمنی غذا و سهولت اجرای رهیافت HACCP در صنعت غذا می‌باشد. (۹و۱۷و۱۸و۱۹و۱۹و۲۰و۲۲و۲٤)

بنابراین در این مطالعه بعد از انجام مراحل اسپورزایی، با تلقیح ٤×١٠^{٤} اسپورکلستریدیوم بوتولینم تیپ A در هر میلی‌لیتر محیط کشت (Brain Heart Infusion broth) BHIتحت تأثیر شرایط محیطی به صورت چندفاکتوری (Multi factorial) نظیر pH (۵/۵ و ٦/۵) ؛ نمک (۰/۵و ۳و ٦) درصد ؛ حرارت نگهداری ^{o}C(۱۵و۲۵و۳۵) رشد و توکسین‌زایی باکتری در طی ۳۲ روز نگهداری (در روزهای ۲و٤و۸و۱٦و۳۲) مورد بررسی قرار گرفت**نتایج** مشاهدات ماکروسکوپیک از میان ۵۰ روده جمع آوری شده از کشتارگاه تمامی روده ها چین خورده و ضخیم بوده و تغییر رنگی از سفید شیری تا زرد داشتند. گره های لنفاوی روده بندی آنها متورم و بزرگ بوده اما هیچ گونه طنابی شدن عروق لنفاوی در پرده های سروزی مشاهده نگردید.

بر این اساس موارد نمونه برداری شده در گروههای متفاوتی قرار گرفتند و و دو ویژگی فوق در آنها طبقه بندی گردید (جدول ۱).

مواد و روش کار

الف – اختصاصات باکتری مورد مطالعه

کلستریدیوم بوتولینم تیپ A تهیه شده از کلکسیون میکروبی پروفسور جنی جورجیس(Geni Georgis)، دپارتمان دانشگاه دیویس کالیفرنیا به عنوان باکتری مورد مطالعه انتخاب شد.

ب- اسپورزایی کلستریدیوم بوتولینم تیپ A با استفاده از محیط کشت جامد و شمارش اسپور

پس از سه بار کشت و پاساژ متوالی باکتری مورد مطالعه در آبگوشت BHI موجود در لوله‌های در پیچ‌دار حاوی وازپار، تحت شرایط بی‌هوازی و گرمخانه گذاری در ^{o}C۳۵ به مدت ٢٤ ساعت؛ از آن به عنوان محیط پایه جهت اسپورزایی استفاده شد و به محیطهای کشت متعدد Egg Yolk Agar و Brain Heart Infusion Agar به صورت سطحی و پُر، کشت و تحت شرایط بی‌هوازی؛ در ^{o}C۳۵ گرمخانه‌گذاری گردید.

اسپورزایی از روز چهارم شروع و تا روز پانزدهم که حداکثر اسپور (حدود بیش از ۹۰٪ اسپور آزاد در یک شان میکروسکوپی) مشاهده شد، ادامه داشت. در طی این مدت مشاهدات روزانه ویدیومیکروسکوپی با تهیه لام مرطوب، گسترش رنگ‌آمیزی اسپور باماالاشیت گرین صورت پذیرفت.

سپس جهت جمع‌آوری اسپورها، با استفاده از روش Sweeping، کلنی‌های موجود در سطح پلیتها با محلول بافر فسفات با pH: ۷/۲ تحت شرایط آسپتیک ، جمع‌آوری و به لوله‌های سانتریفوژ استریل ۵۰ میلی لیتری حاوی ساچمه شیشه‌ای (Pearls) انتقال داده شد و ۵ بار عمل سانتریفوژ کردن « $۵۰۰۰-۱۰۰۰۰ \quad rpm/۲۰'/ ۴^{o}C$ » تاحصول به

رسوب سفیدرنگ حاوی اسپور انجام شد. جهت از بین بردن سلولهای رویشی موجود در سوسپانسیون حاوی اسپور ابتدا از تیمار حرارتی ۱۰۰ °C/۱۰′ و سپس تیمار الکل اتیلیک ۷۰٪ فیلتر استریل شده استفاده شد. بعد از تیمار توام حرارتی – الکلی؛ شستشوی مجدد سوسپانسیون اسپورباژل فسفات بافر و سانتریفوژ یخچال‌دار، جهت خروج الکل اضافی صورت پذیرفت و رنگ‌آمیزی اسپور و تهیهٔ لام مرطوب نیز جهت اطمینان از تخریب سلولهای رویشی به عمل آمد.

سپس به منظور تعیین تعداد مشخص اسپور موجود در هر یک از سوسپانسیون اسپورپایه؛ دوبار رقتهای متوالی 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه و کشت سطحی از ان در EYA (سه بار تکرار) تحت شرایط بی‌هوازی (ساعت ۳۵°C/۴۸) به عمل آمد و در خاتمه شمارش اسپورانجام و تا اجرای مرحلهٔ دوم در ٤°C نگهداری شد.

ج- تلقیح 4×10^4 اسپور کلستریدیم بوتولینم تیپ A در هر میلی لیتر محیط کشت B.H.I تحت تأثیر پارامترهای درون اثر و برون اثر نظیر pH، نمک و حرارت در طی ۳۲ روز.

در این بررسی مطالعات تلقیحی در دو دفعه جداگانه و در هر دفعه به صورت دوبار تکرار و در محیط کشت مایع B.H.I انجام شد. به نحوی که پس از حل کردن مقدار مشخص از محیط B.H.I در آب مقطر به کمک حرارت ملایم، توزین و حل کردن نمک با غلظتهای (۰/۵ ، ۳ ، ٦) درصد، تنظیم pH هر یک از حالات قبلی به کمک اسید کلریدریک و پتاس یک نرمال صورت گرفت. پس از اتوکلاو لوله‌های در پیچ‌دار حاوی ترکیبات گفته شده مجدداً تنظیم pH انجام شد. در مرحلهٔ بعدی لوله‌ها را با درب شُل در حمام آب گرم ۸۰ °C/۱۰′ قرار داده بدون حرکت در لوله‌ها را محکم پیچ نموده، بلافاصله سرد نموده و تلقیح ۱cc از سوسپانسیون اسپور به طور عمقی به زیر محیط کشت مایع B.H.I انجام و وازپاراستریل بر روی آن ریخته شد و در پایان هر ۳ سری لوله ۱۲ تایی به ترتیب در گرمخانه‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد تحت شرایط بی‌هوازی نگهداری شدند. بازدید و برداشت لوله‌های کدر در طی روزهای (۲، ٤، ۸، ١٦ و ۳۲) از انکوباتورها صورت پذیرفت و جهت تأئید رشد باکتری در آنها؛ علاوه بر تهیهٔ گسترش و رنگ‌آمیزی، مشاهده کلنی‌های مشخص کلستریدیم بوتولینم تیپ A پس از کشت خطی از لوله‌های کدر به محیط کشت حاوی EYA انجام گرفت.

د- بررسی توکسین‌زایی باکتری با انجام آزمایشی زیستی بر روی موش

بعد از خروج لوله‌های کدر مرحله قبل از انکوباتورها؛ سانتریفوژ آنها تحت شرایط ۴°C /۱۵′/ RPM ۷۰۰۰ انجام و جهت تعیین توکسین در نمونه‌ها، قسمت زلال‌رویی را به لوله‌های پلی استرینی درب دار استریل منتقل نموده و تا زمان آزمایش بر روی موش در ۲۰oC- منجمد گردیدند. روش کار بر اساس دستور العمل پیشنهادی USDA انجام شد. موشهای مورد آزمایش همگی ماده از نژاد، سوری، out bred با وزن ۲۵-۱۸ گرم و ۸-٦ هفته سن بودند. قبل از تزریق به موش، ابتد ا جهت خروج از انجماد؛ نمونه‌ها باید نیم ساعت در دمای اطاق نگهداری شوند و سپس محتویات هر لوله به دو قسمت شوند، به طوری که بر روی یکی تیمار حرارتی ۱۰۰ °C/۱۰′ و بر روی دیگری تیمار حرارتی صورت نگیرد. بدین ترتیب از هر لوله، به ٤ موش و به هر یک به میزان ۰/۵cc داخل صفاتی (Intraperitonal) تزریق انجام شد و موشها جهت مشاهده علائم بوتولیسم به مدت ٢٤-٦ ساعت تحت مراقبت و نظر قرار گرفتند.

نتایج

الف – نتـایج اسـپورزایی و شـمارش اسـپور در محـیط کشت جامد

اسپورزایی در دو نوع محیط کشت جامد از روز چهارم شروع و تا روز پانزدهم ادامه داشت. تعداد اسپور به ترتیب در محیط کشت جامد EYA به میزان 10^8 و در محیط کشت جامد B.H.I 10^9 اسپور شمارش گردید.

ب- نتایج حاصل از تأثیر عوامل درون اثر و برون اثر pH، نمک و حرارت بر روی زمان رشد و توکسین زایی 4×10^4 اسپورکلستریدیم بوتولینم تیپ A در طی ۳۲ روز در محیط مایع B.H.I

نتاج حاصله در قالب طرح کاملاً تصادفی و تستANOVA و ارائه تجزیه واریانس صفت رشد (مشاهدهٔ کدورت) و صفت توکسین‌زایی در برنامهٔ کامپیوتری SAS آمده است. با مراجعه به جدول شماره یک و نمودارهای ۱ تا ٤ اختلاف آماری معنی‌دار $P\leq0/001$ در رشد توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A ، بین حرارتهای مختلف، غلظتهای متفاوت نمک و pH ودر طی زمان نامبرده مشاهده می‌شود به نحوی که این اختلاف آماری در بین حرارت 15^oC با هر یک از دو دمای دیگر یعنی 35^oC و 25^oC کاملاً معنی‌دار بوده و هیچگونه رشدی در 15^oC دیده نمی‌شود در حالیکه رشد و توکسین زایی در 35^oC در مقایسه با 25^oC در مدت زمان کمتری رخ داده است(نمودار ۱).

- همچنین اختلاف آماری معنی‌داری در کاربرد غلظت نمک ٦٪ در مقایسه با دو غلظت دیگر دیده شد بدین معنی که هیچگونه رشدی با غلظت ٦٪ نمک مشاهده نشده و در حالیکه رشد و توکسین زایی با غلظت نمک ۰/۵ درصد در مقایسه با نمک ۳٪ در مدت زمان کوتاهتری صورت پذیرفته است.

- بین دو میزان pH (۵/۵ و ٦/۵) نیز اختلاف آماری معنی‌دار بوده و هیچگونه رشدی در pH : ۵/۵ حاصل نشده است.

- تأثیر متقابل نمک و pH نیز نشانگر تأثیر قطعی pH : ۵/۵ در عدم رشد باکتری در کلیهٔ غلظتهای نمک می‌باشد ولی در pH:٦/۵ با کاهش نمک از ۳ به ۰/۵ درصد رشد و توکسین‌زایی در مدت زمان کمتری صورت پذیرفته است. (نمودار شماره ۲)

- تأثیر متقابل حرارت و pH گویای تأثیر قطعی pH : ۵/۵ در عدم رشد باکتری در کلیهٔ حرارتها می‌باشد ولی در pH: ٦/۵ و با افزایش دما از 25^oC به 35^oC، رشد توکسین زایی در مدت زمان کمتری صورت پذیرفته است (نمودار ۳).

- و بالاخره تأثیر متقابل نمک و حرارت نیز تأثیر قطعی نمک ٦٪ را در عدم رشد باکتری در کلیهٔ حرارتها نشان می‌دهد و یک اثر جایگزینی بین دو فاکتور دما و نمک در زمان رشد و توکسین‌زایی باکتری کلستریدیم بوتولینم مشاهده می‌شود. به طوری که این زمان در اثر کاربرد نمک ۰/۵ درصد و دمای 25^oC مشابه کاربرد نمک ۳٪ و دمای 35^oC می‌باشد. و با کاهش غلظت نمک از ۳ به ۰/۵ درصد در هر یک از حرارتها، زمان رشد کاهش می‌یابد (نمودار ٤).

ج- نتایج حاصل از تزریق نمونه‌های کدر به موش

بعد از تزریق نمونه‌های تیمار حرارتی $100\ ^oC/10'$ و حرارت ندیده هر یک از لوله‌های کدر ، به دو جفت موش که بر طبق دستورالعمل پیشنهادی USDA صورت گرفت؛ فقط موشهایی که نمونه‌های حرارت ندیده را دریافت کرده بودند در طی ٢٤-٦ ساعت بعد از تزریق با علائم بوتولیسم یعنی سیخ شدن موها، تنفس سخت، ضعف ماهیچه‌های پا، تنفس شکمی و بالاخره وقفه تنفسی مردند.

علت عدم مرگ موشها در اثر تزریق نمونه های تیمار حرارتی بر خلاف نمونه حرارت ندیده آن است که گروههای آزاد شیمیایی سم در اثر حرارت جوش غیرفعال شده‌اند. لذا در این مطالعه به موازات رشد باکتری (کدورت)، توکسین زایی باکتری نیز تأئید می‌گردد و روش

ارزیابی زیستی روی موش «Mouse Bioassay» بر خلاف روشهای گران و سریع ازمایشگاهی نظیر PCR (Polymerase Chain Reaction)؛ (Monoclonal Antibody)MAB Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) ELISA)؛ و ... به علت آنکه از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار می‌باشد؛ ارجحیت خاصی دارد (۱۳).

بحث

الف – اسپورزایی و شمارش

روشهای متفاوتی جهت اسپورزایی توسط محققین ارائه گردیده است که اساس و پایه کار همه یکسان است. به طوری که استفاده از محیط کشت جامد EYA در مطالعات رضویلر و همکاران (۱۳۸۰)؛ استفاده از محیط کشت دوفازی توسط Anellis و همکاران (۱۹۷۲) و بالاخره استفاده از محیط کشت مایع به ترتیب Cooked Meat Broth و Chopped liver Broth در مطالعات Solmon و همکاران (۱۹۹۸) Trypicase Peptone Glucose Yeast Extract Broth توسط Varnum و همکاران (۱۹۹۱) و Austin (۱۹۹۸) گزارش شده است (۲۹،۲۶،۶،۵،۳).

به نظر می‌رسد استفاده از محیط کشت جامد (EYA و BHI) بدلیل اسپورزایی در مدت زمان کوتاهتر و شمارش اسپور به میزان بیشتر در مقایسه با محیط کشتهای دیگر قابل توجه می‌باشد.

علاوه بر آن شناسایی آسان و راحت پرگنه‌های کلستریدیم بوتولینم بر روی محیط کشت، پخش بوی نامطبوع حاصل از تجزیهٔ پروتئولتیکی به میزان کمتر؛ حمل و نقل آسان محیطهای کشت در جار بی‌هوازی؛ ایمنی بیشتر حین کار در آزمایشگاه و آسانی و راحتی کار در حین تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی از نکات برجسته استفاده از محیط کشت جامد (BHI , EYA) در مقایسه با محیط کشت مایع و دوفازی می‌باشد.

ب- تأثیر متقابل پارامترهای درون اثر و برون اثر pH، نمک و حرارت بر زمان رشد و توکسین‌زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A در طی ۳۲ روز نگهداری و با تلقیح ۴×۱۰^{۴} اسپور در هر میلی لیتر مایع BHI

امروز با مطرح شدن تجارت بین‌المللی غذا و صادرات انواع موادغذایی متنوع و با اجزاء متشکله و فرمولاسیون مختلف و روی‌آوردن بیشتر مردم به مصرف آنها، نظیر غذاهای فوری (Fast Foods)، مسئله تأمین سلامتی غذا بیش از گذشته مطرح می‌باشد. افزایش دانش و اطلاعات ما از پاسخ عملکرد فیزیولوژیک باکتریهای پاتوژن غذازاد نظیر بقاء، رشد و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم در برابر عوامل بازدارنده رشد موجود در درون غذا و شرایط نگهداری آن می‌تواند به عنوان یک اهرم قوی نه تنها در خدمت تأمین سلامتی و ایمنی غذا بلکه حتی به بهبود و تغییر طراحی تولید؛ فرآوری و فرمولاسیون آن نیز بیانجامد.

لذا جهت تشریح رفتار پاتوژنهای غذازاد از میکروبیولوژی پیشگویی کننده و متعاقب آن مدلسازی پیشگویی کننده بهره برده می‌شود که به صورت مطالعات چالشی تلقیحی در محیط کشت آزمایشگاهی و سپس در غذا به صورت Inoculom Pack Study انجام می‌پذیرد (۲٤،۲۳،۲۲،۱۷،۱٦،۸). پیشرفتهای علمی در دو دهه اخیر نشانگر آن است که کاربرد فاکتورهای بازدارنده رشد پاتوژن ها که در حالت انفرادی مؤثر نمی باشند اگر به صورت گروهی با یکدیگر به کار برده شوند می توانند از رشد آنها در غذا جلوگیری به عمل آورند. به طوریکه جهت پیشگیری و کنترل ژرمیناسیون و تکثیر سلولهای رویشی و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم نیز در مطالعات تلقیحی انجام یافته در محیط کشت، از کاربرد و دستکاری فاکتورهای داخلی و خارجی مؤثر بر رشد، نظیر pH، نمک، حرارت، مواد نگهدارنده و ... استفاده می‌شود.

در مطالعهٔ حاضر تأثیر همزمان پارامترهای مختلف نظیر pH (۵/۵ و ۶/۵) ؛ حرارت ^{o}C(۱۵، ۲۵، ۳۵) و نمک (۰/۵، ۳، ۶) درصد در طی ۳۲ روز نگهداری بر روی رشد و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A با میزان ۴×۱۰^{۴} اسپور در هر میلی لیتر از محیط کشت BHI بررسی شده است و مشاهده شد که با میزان تلقیح مزبور و افزایش غلظت نمک تا ۶٪ و کاهش pH تا ۵/۵ و کاهش حرارت نگهداری تا $۱۵^{o}C$ هیچگونه رشد و توکسین‌زایی در طی ۳۲ روز مشاهده نشد.

باکتری کلستریدیم بوتولینم نظیر سایر میکروارگانیزم‌ها جهت تنظیم pH خود ساختار خاصی نداشته، تحت تأثیر pH محیط کشت یا ماده غذایی قرار می‌گیرد. بنابراین نه تنها سرعت رشد، بلکه میزان بقاء باکتری در طول نگهداری، حرارت دادن و سایر فرآیندها نیز به pH وابسته می‌باشد. و نامناسب بودن pH با ایجاد اختلال در انتقال مواد مغذی بداخل سلول باکتری و کاهش فعالیتهای آنزیمی سبب عدم رشد باکتری می‌شود (۲۴،۲۳،۱۹،۸،۱).

محدوده pH مطلوب رشد تیپ A یا B این باکتری توسط Sperber (۱۹۸۲) ۸/۸۹-۵/۰۱ و محدودهٔ رشد پروتئولیتیکها و غیرپروتئولیتیکها توسط Varnum (۱۹۹۱) ۷-۶/۸ گزارش شده است. Varnum تعیین حداقل pHرا در پروتئولیتیکها پیچیده ذکر می‌نماید (۲۹،۲۷).

در بررسیهای متعدد انجام یافته نیز عوامل مختلفی را در رشد باکتری تحت pH غیر متعارف گزارش نموده اند از جمله می توان به نوع سویه باکتری، میزان تلقیح، مواد مغذی در محیط رشد نظیر میزان پروتئین ، چربی، نمک و غیره اشاره کرد (۳۱،۳۰،۲۴،۱۲،۹،۸،۴).

در مطالعهٔ کنونی نیز به نظر می‌رسد که سایر شرایط محیطی بازدارندهٔ رشد کلستریدیم بوتولینم تیپ A در صورتیکه در حد مطلوب نباشند می‌توانند سبب تغییر در میزان pH محدود کننده رشد شوند. به طوری که کاربرد توام افزایش نمک (۶٪)، کاهش حرارت ($۱۵^{o}C$) و pH:۵/۵ با میزان تلقیح ۴×۱۰^{۴} باکتری در طی ۳۲ روز توانسته است از رشد و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A جلوگیری عمل آورد.

مشابه نتایج بررسی کنونی، Doyle,ME (۲۰۰۱) نیز عدم ژرمیناسیون و یا رشد آهسته اسپورهای این باکتری را در pH:۵/۵ گزارش نموده است (۱۱).

همچنین بر طبق گزارشات منابع مختلف میزان نمک بازدارنده رشد کلستریدیم بوتولینم تیپ A ۱۰٪ ذکر شده است. مطالعه Kiss,I و همکاران مبنی بر عدم رشد سویه‌های مختلف کلستریدیم بوتولینم نظیر ۶۲A؛ ۳۳A؛ ۵۱B در غلظت نمک ۶٪ می‌باشد. در این بررسی نیز رشد و توکسین‌زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A در غلظت ۶٪ نمک مشاهده نشد به نظر می‌رسد که نمک در غلظتهای بالا از طریق جذب آب سلول باکتری سبب پلاسمولیز و یکسری وقایع متابولیکی مرتبط در باکتری می‌شود به طوری که از طریق صدمه به غشاء سلولی و نتیجتاً کاهش نفوذپذیری آن، همچنین عدم سنتز پروتئین و آنزیم‌های آنها سبب حساس شدن باکتری به سایر فاکتورهای محیطی و بالاخره وقفه رشد در باکتری می‌گردد(۲۱).

Gould خاطر نشان نمود که کاربرد میزان نمک ۷-۴٪ با انکه سبب ژرمیناسیون اسپورها می‌گردد، ولی می تواند از تکثیر سلولهای رویشی جلوگیری به عمل بیاورد(۱۴). در مطالعات Doyle, M.E نیز که در مورد کینتیک ژرمیناسیون اسپورهای کلستریدیم بوتولینم تحت تأثیر دمای (۱۵، ۲۲، ۳۰) درجه سانتیگراد، pH (۵/۵ و ۶ و ۶/۵) غلظت نمک (۰/۵و ۲و ۴) درصد صورت پذیرفت نتیجه گرفته شد که افزایش غلظت نمک خصوصاً در دما و pH پایین از ژرمیناسیون باکتری جلوگیری به عمل می آورد(۱۱).

حداقل و حداکثر درجه حرارت رشد کلستریدیم بوتولینم تیپ A ذکر شده توسط منابع مختلف $۱۲^{o}C$-۱۰ و $۵۰^{o}C$-۴۸ و اپتیمم رشد آن $۳۵^{o}C$ گزارش شده است. درجه حرارت رشد در این باکتری توسط ژن ویرولانس بیان

می‌شود و عوامل مختلفی نظیر تعداد، گونه، سویه باکتری، نوع محیط کشت، میزان pH و غیره می‌توانند بر روی آن موثر باشند(۳۲،۲۵،۲٤،۱۸،۱۲).

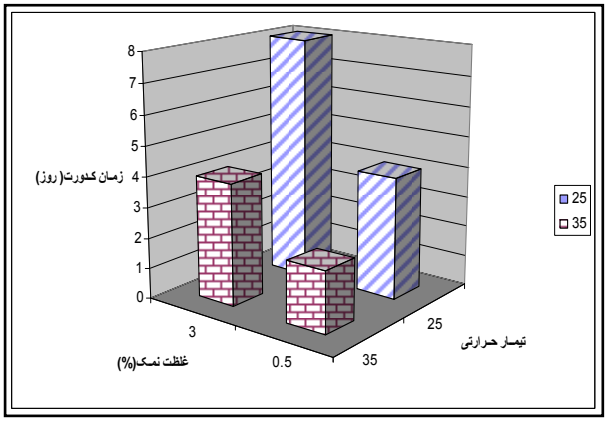
کاربرد حرارت پایین رشد قادر است حتی اگر باکتری در حالات مختلف فیزیولوژیکی نظیر اسپورزایی، ژرمیناسیون و یا outgrowth باشند از رشد و توکسین‌زایی آن جلوگیری به عمل آورد. مشابه نتایج بررسی کنونی در مطالعات Schaffner و همکارانش (۱۹۹۸) گزارش شده است، بطوریکه کمترین احتمال توکسین زایی باکتری کلستریدیم بوتولینم تیپ A در $15^{o}C$ و بیشترین احتمال توکسین زایی آن در بیش از $30^{o}C$ مشاهده شده است. به نظر می رسد که در این مطالعه کاربرد حرارت $15^{o}C$در ترکیب با سایر شرایط محیطی دیگر از طریق کند نمودن فعالیتهای فیزیولوژیک نظیر واکنشهای آنزیمی خاص، کاهش سیالیت غشاء پلاسمایی و نتیجتاً کاهش تبادل مواد غذایی از رشدو توکسین‌زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A جلوگیری به عمل آورده است(۲۵).

Graham نیز در بررسیهای خود توانست با تغییر توأم پارامترهای حرارتی و pH در شرایط نامطلوب از رشد و توکسین زایی باکتری کلستریدیم بوتولینم جلوگیری به عمل آورد(۱۵). همچنین Schaffner با کاربرد حرارت $15^{o}C$ و pH : ۵/۵ نشان داد که احتمال رشد و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم ٦٢A در طی ۹۲ روز کاهش یافته است. Whiting, R,C نیز در بررسی زمانی مدل رشد کلستریدیم بوتولینم پروتئولیتیک تأخیر رشد و توکسین‌زایی باکتری مزبور را در طی ٦٢ روز نگهداری با کاربرد حرارت کمتر از $20^{o}C$ و pH کمتر از ۵/۵ مشاهده نمود(۳۰).

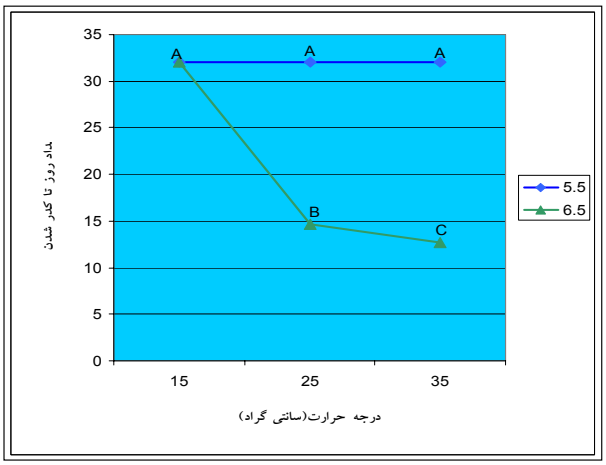
علاوه بر درجه حرارت، زمان نیز به خاطر تأثیری که بر روی رشد میکروبی می گذارد، در تعیین سلامت ارگانولپتیک ماده غذایی و نیز سلامت میکروبی و بالاخره تعیین زمان ماندگاری غذا(Shelf life) مؤثر می‌باشد در این مطالعه یک رابطهٔ دو سویه زمان – دمایی در رشد و توکسین‌زایی باکتری کلستریدیم بوتولینم تیپ A مشاهده شد به نحوی که با افزایش دما از $25^{o}C$ به $35^{o}C$ این زمان کاهش یافت و ضمن آنکه رشد و توکسین‌زایی در pH: ٦/۵ نمک (۰/۵ و ۳) درصد و حرارت ^{o}C(۲۵و۳۵) مشاهده شد؛ کوتاهترین زمان ایجاد کدورت در شرایط مطلوب رشد یعنی حرارت $35^{o}C$ ، نمک ۰/۵ درصد و pH : ٦/۵ صورت پذیرفت که در بررسیهای Zhao و همکاران (۲۰۰٤) نیز بهترین شرایط رشد در pH: ٦/۵ و نمک ۰/۵ درصد و بدترین شرایط رشد و توکسین زایی در pH:۵/۵ و نمک ٤٪ فراهم شده (۳۱) ؛ همچنین در مطالعه دیگری از آنها عدم کفایت تأثیرکاربرد pH: ۵/۵ و یا نمک ٤ درصد به تنهایی در مقایسه با ترکیب توأم آنها در جلوگیری از ژرمیناسیون، و رشد باکتری کلستریدیوم بوتولینم تیپ A ثابت شده است. (۳۲) لذا در خاتمه پیشنهاد می‌شود تأثیر مجموعه‌ای از فاکتورهای به کار رفته در این بررسی نظیر pH، دما، غلظت نمک و به علاوه انواع مواد نگهدارنده نظیر نیتریت، بنزوات وغیره بر روی بازدارندگی رشد اسپورهای این باکتری و نه تنها در محیط کشت بلکه در غذاهای در معرض خطر (High risk) نیز مورد بررسی قرار بگیرد.

تشکر و سپاسگزاری

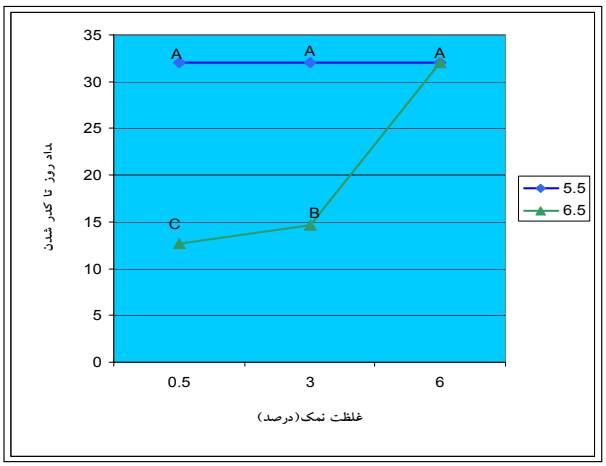
بدینوسیله از ریاست محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات و سایر کارشناسان آزمایشگاههای دامپزشکی به خصوص آقای رضا عصاره تشکر و قدردانی می گردد.



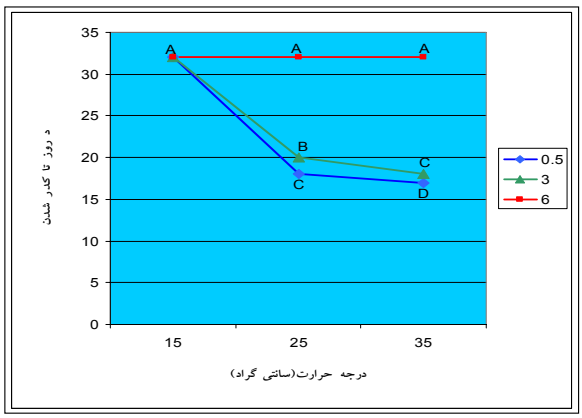
نمودار ۱ : تأثیر متقابل حرارت (۱۵ و ۲۵ و ۳۵) درجه سانتیگراد و نمک (۰/۵ و ۳ و ۶) درصد بر روی رشد و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A در طی ۳۲ روز و با میزان تلقیح 4×10^4 cfu/ml



نمودار ۲ : تأثیر متقابل pH (۵/۵ و ۶/۵) و نمک (۰/۵ و ۳ و ۶) بر روی رشد و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A در طی ۳۲ روز و با میزان تلقیح 4×10^4 cfu/ml



نمودار۳ : تأثیر متقابل pH (۵/۵ و ۶/۵) و حرارت (۱۵ و ۲۵ و ۳۵) بر روی رشد و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A در طی ۳۲ روز و با میزان تلقیح cfu/ml 4×10^4



نمودار ٤ : تأثیر متقابل نمک (۰/۵ و ۳ و ٦) و حرارت (۱۵ و ۲۵ و ۳۵) بر روی رشد و توکسین زایی کلستریدیم بوتولینم تیپ A در طی ۳۲ روز و با میزان تلقیح cfu/ml 4×10^4

جدول ۱ : جدول تجزیه واریانس صفت زمان کدرشدن با روش ANOVA متأثر از تغیرات pH ، نمک، حرارت در طی ۳۲ روز در کلستریدیم بوتولینم تیپ A با میزان تلقیح 4×10^4cfu/ml

منابع تغییرات	درجه آزادي	مجذورات	میانگین مجذورات
درجه حرارت	۲	۱۳۵٦/٤٤	٦۷۸/۲۲
نمك	۲	۱۳۵٦/٤٤	٦۷۸/۲۲
pH	۱	۲٦۸۸/۸۸	۲٦۸۸/۸۸
درجه حرارت * نمك	٤	٦۸٦/۲۲	۱۷۱/۵۵
درجه حرارت * **pH**	۲	۱۳۵٦/٤٤	٦۷۸/۲۲
pH * نمک	۲	۱۳۵٦/٤٤	٦۷۸/۲۲
درجه حرارت * نمك * **pH**	٤	٦۸٦/۲۲	۱۷۱/۵۵
خطا	٥٤	۰	۰
جمع کل	۷۱	۹٤۸۷/۱۱	

فهرست منابع

۱. ادیب فر، پرویز. (۱۳۸۰) میکروبشناسی پزشکی، انشارات دانشگاه تهران. صفحات ٤٩-٤٥ و ٣٠١-٢٩١.

۲.رضویلر ، ودود. (۱۳۷۸) میکروبهای بیماری زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیتهای غذایی. انتشارات دانشگاه تهران. صفحات ۲۳-۱۸ و ۱٦۹-۱٦۳

۳. رضویلر، ودود. صفری، رضا. پورغلام، رضا (۱۳۸۰) مطالعهٔ پتانسیل رشد و توکسین‌زایی کلستریدیم بوتولینم و اشرشیاکولای متأثر از فرمولاسیونهای مختلف و مواد نگهدارنده مورد پیش بینی در فرآوری خاویار. مجلهٔ دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ٥٦، شماره۲،۱٤-۹.

4. Alberto, F. Broussolle, V. Mason, DR. Carlin, F. Peck, MW.(2003) Variability in spore germination response by strains of proteolytic Clostridium type A, B and F. lett. Appl. Microbiol; 36(1) :41-5.

5.Anellis, A. Berkowtiz, D. Kremper, D. and Rowley, D. B. (1972) Production of type A, B spores of Clostridium botulinum by biphasic method effect on spore population, radiation, toxigenicity. Applied Microbiology. 23(4): 734-739.

6.Austin, J. W. (1998). Clostridium botulinum research , Botulinum refrence service for Canada. Health protection Branch Ottawa. Laboratory Procedure. MFLP-44.

7.Bad Bug Book (1992) Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins HandBook. USFDA center for Food Safety and Applied Nutrition.

8.Bell, Ch. and Kyriatides , A(2000) Practical Food Microbiology Series, Clostridium botulinum. A practical to the organism and it's control in Foods. Black well science.

9.Carpenter, Ph.L (1972) Microbiology of 3rd edition. W. B. Saunders company. Philadelphia. London – Toronto.

10.Clavero , M. R. S. Brackett, R. E. Beuchat, L. R. and Doyle , M. E. (2000) Influence of water activity and storage conditions on survival and growth of proteolytic Clostridium botulinum in peanut spread. Food Microbiology, 17: 53-61.

11.Doyle, M. E.(2001). Clostriduim botulimun Fact sheet. Food research institute, University of Wisconsin-Madison.

12.Elliott, P.H and Schaffner , D. W (2001) Germination, growth and toxin production of nonproteolytic Clostridium botulinum as affected by multiple barrier. Journal of Food Science. 66(4): 575-579.

13.Ferreira, J. L. Eliasberg, S. J. Edmonds, P. and Harrison, M.A. (2004) Research note: Comparison of the Mouse Biosassay and Enzyme – linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in Food. Journal of Food Protection, 67(1): 203-206.

14.Gould, G. W. (1964) Effect of food preservatives on the growth of bacteria from spores. P: 17-24 in N. Molin: Microbial Inhibitors in Food. Almgrist and wiksell, stockolm.

15.Graham, A. F. and Lund, B. M. (1987). The combined effect of sub-optimal temprature and sub-optimal pH on growth and toxin fromation from spores of Clostridium botulinum. J. Appl. Bacteriol. 63(5): 387-93.

16.Hauschid, A. H. W. (1989) Clostridium botulinum in Foodborne Bacterial Pathogens. Morcel Dekker, Inc, New York, USA,: 111-189.

17.International Commission on Microbiological Specification for Foods. (1996) Microorganisms of Foods.5. Microbiological Specifications of Food Pathogens. Blackie Academic and proffessional. London, UK.

18.International Edition : Bergey's manual of determinative bacteriology (1994). Publishers : Williams and wilkins. Ninth edition: 1141-1160.

19.Jay. J. M. (2000) Modern Food Microbiology. 6th ed. Gaithersburg (MD): Aspen.

20.Joyce, H. (2000). Bio 203, General microbiology and infection control anaerobic bacteria, foodborne botulism , Delta collage web page: http://www.delta.Edu/gahoward.

21.Kiss, I. Rhee, C. O. Grecz, N. Roberts, T. A. and Frankas, J.(1978) Relation between radiation and salt sensivity of spores of five strains of Clostridium botulinum type A,B and E.
Applied and Environmental Microbiology, 35(3): 533-539.

22.McMeekin, T. A. Brown, J. Krist, K. Miles, D. Neumeyer, K. Nichols, D.S Olley, J. presser, K. Ratkowsky, D.A. Ross, T. Salter, M. and Soontranon, S. (2002) Quantative Microbiology ; A basis for Food Safety. 3(4): 1-12.

23.Mossel, D.A.A. Corry, J.E.L. Struijk, C.B. Baird, R. M. (1995) Essentials of the Microbiology of Foods. Chichester (England); John wiely and Sons: 699.

24- Montville, T. J. and Matthews, K. R. (2001) Food Microbiology. Chapter 2: Principles which influence microbial growth , survival and death in foods, Washington (DC): 13-32.

25.Schaffners, D. W; and Ross, W. H; and Montville, T. J. (1998) Analysis of the influence of Environmental parameters on clostridium botulinum time to toxicity by using three modeling Approchest. Applied and Environmental Microbiology, 46(11): 4416-4422.

26.Solmon, H. M. and Timothy L. J. (2001). Bacteriological Analytical Manual Clostridium botulinum. 8th Edition Revision A. chapter: 17,12.

27.Sperber, W. H. (1982) Requirements of Clostridium botulinum for growth and toxin production. Food Technol, 36(12): 89-93.

28.Vanderzant, C. Splittstoesser, D. F. (1992) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Clostridium botulinum and it's toxins. Chapter 6: 605-621.

29.Varnum, A. H. and Evans , M. G. (1991). Food borne Pathogen: Wolf. London. : 249-315.

30.Whiting, R. C. and Call, J. E. (1993) Time of growth model for proteolytic Clostridium botulinum. Food Microbiology , 10(4) : 295-301.

31.Zhao, L. Montville, T. J. schaffner, D.W. (2004). Effect of inoculom size on maximum growth rate, lag time and maximum percent growth of Clostridium botulinum at varying pH and salt

concentration. Food science, Rutgers University, 65. Dudly Road, New Brunswick, NJ 901

32- Zhao, L. Montville, T. J. Schaffner, D.W. (2000) Inoculum size of Clostridium botulinum 56A spores influences time to detection and percent growth positive samples. Journal of Food Science, 65(8).