



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Janika Koponen

Clostridium botulinum -ryhmän II itiöiden lämmönkestävyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

9.5.2019

| | |
|--|--|
| Tekijä Otsikko | Janika Koponen <i>Clostridium botulinum</i> -ryhmän II itiöiden lämmönkestävyys |
| Sivumäärä Aika | 23 sivua + 1 liite 9.5.2019 |
| Tutkinto | Laboratorioanalytiikka (AMK) |
| Tutkinto-ohjelma | Laboratorioanalytiikka |
| Ammatillinen pääaine | |
| Ohjaajat | Tohtorikoulutettava Noora Pernu Lehtori Jarmo Palm |
| <p><i>Clostridium botulinum</i> tuottaa maailman voimakkainta luonnollista myrkyä, botulinumneurotoksiinia, joka toisinaan aiheuttaa botulismia. Botulismia esiintyy useissa eri muodoissa, joista yksi on elintarvikevälikiteinen ruokamyrkytysbotulismi. <i>C. botulinum</i> -itiöt ovat ongelmallisia elintarviketeollisuudessa, sillä ne kestävät korkeita lämpötiloja eivätkä tuhoudu niissä lämpötila-aika yhdistelmissä, joissa suurin osa vegetatiivisista bakteereista tuhoutuu. Tarpeeksi tehokkaalla kuumennuksella itiöt voidaan tuhota, mutta se voi samalla heikentää elintarvikkeen aistinvaraista laatua. Tässä opinnäytetyössä tehdyt kuumennuskokeet ovat osa monivuotista tutkimushanketta, jonka tavoitteena on muun muassa tutkia <i>C. botulinum</i> -ryhmän II lämmönkestävyyttä ja muodostaa riskinarviointimalli <i>C. botulinum</i> -kasvun ja toksiinituotannon riskistä.</p> <p>Lämmönkestävyyttä tutkittiin tässä opinnäytetyössä kuumennuskokeilla MPN-menetelmää hyödyntäen. Kuumennuskokeet tehtiin vesihautteessa, jolla haluttiin simuloida elintarviketeollisuudessa käytettyä sous vide -kypsennystä. MPN-menetelmä on todennäköisyyteen perustuva laskumenetelmä, jonka avulla lasketaan bakteerien, tai tässä tapauksessa itiöiden, kaikkein todennäköisin määrä. Tavoitteita näillä kokeilla oli tutkia <i>C. botulinum</i> ryhmän II itiöiden lämmönkestävyyttä, kantojen vertailu sekä lysotsyymien vaikutus itiöiden lämmönkestävyyteen. Lysotsyymiä esiintyy joissain elintarvikkeissa, ja sen on huomattu parantavan itiön lämmönkestävyyttä.</p> <p>Näytteet, joihin lisättiin lysotsyymiä, kestivät huomattavasti paremmin kuumuutta ja vaativat pidempiä kuumennusaikoja samassa lämpötilassa kuin näytteet, joissa ei ollut lysotsyymiä. Dataa oli loppujen lopuksi niin vähän, ettei vahvoja päätelmiä voitu tehdä kantojen eroavaisuuksista. Niiden perusteella näytti kuitenkin siltä, että toinen kanta kesti paremmin korkeampia lämpötiloja kuin toinen. Kuumennuskokeet kuitenkin jatkuvat vielä tämän opinnäytetyön jälkeenkin, ja näitä tuloksia hyödynnetään lopullisissa päätelmissä.</p> | |
| Avainsanat | <i>Clostridium botulinum</i> , sous vide, valmisruokateollisuus |

| | |
|---|--|
| Author Title Number of Pages Date | Janika Koponen Heat Resistance of <i>Clostridium botulinum</i> Group II Spores 23 pages + 1 appendix 9 May 2019 |
| Degree | Bachelor of Laboratory Services |
| Degree Programme | Laboratory Sciences |
| Professional Major | |
| Instructors | Noora Pernu, PhD candidate Jarmo Palm, Senior Lecturer |
| <p><i>Clostridium botulinum</i> produces the world's strongest natural toxin called botulinum neurotoxin, which causes botulism at times. There are several types of botulism and of them is food transmitted food poisoning botulism. The spores of <i>C. clostridium</i> are problematic in food industry because they can tolerate high temperatures and will not be destroyed in those temperature-time combinations where most of the vegetative bacteria will. With high enough temperature the spores can be destroyed, but this can lower the sensory quality of the food. The heating experiments made in this thesis work are part of a multiyear research project and one of its goals is to study the heat resistance of <i>C. botulinum</i> group II and create an evaluation of <i>C. botulinum</i>'s growth and toxin produce.</p> <p>In this thesis study the heat resistance was studied by heating experiments and MPN method. The heating experiments were executed in water bath in purpose of simulating the sous vide cooking method. The MPN method is based on probability and it is used for counting the most probable number of bacteria, or in this case, spores. The goal of these experiments was to study the heat resistance of the spores of <i>C. botulinum</i> group II, compare different strains and the impact of lysozyme in the spore's heat resistance. Lysozyme is found in some foods and it has been noted that it can increase the spore's heat resistance.</p> <p>The samples with added lysozyme tolerated heat significantly better and required longer heating times in the same temperature than the samples without lysozyme. Eventually, there was insufficient amount of data to state strong conclusions of the differences between strains. But based on the results that was gathered, it seemed that the other strain tolerated heat better than the other. Nevertheless, the heating experiments continues after this thesis study and these results will be used in the final conclusions.</p> | |
| Keywords | <i>Clostridium botulinum</i> , sous vide, convenience food industry |

Sisällys

Lyhenteet

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | <i>Clostridium botulinum</i> | 2 |
| 2.1 | Rakenne ja luokittelu | 2 |
| 2.2 | Sporulaatio ja germinaatio | 3 |
| 2.3 | Lämmönkestävyys | 4 |
| 2.4 | Botulinumneurotoksiini | 5 |
| 2.4.1 | Rakenne ja toiminta | 5 |
| 2.4.2 | Toksiinin käyttö kauneudessa ja lääkehoidossa | 5 |
| 2.5 | Botulismi | 6 |
| 2.5.1 | Botulisman eri muodot ja oireet | 6 |
| 2.5.2 | Yleisyys, hoito, ehkäisy | 7 |
| 3 | Kokeellinen osuus | 8 |
| 3.1 | Näytteiden valmistus ja kuumennus | 8 |
| 3.2 | MPN-menetelmä | 9 |
| 4 | Tulokset | 10 |
| 5 | Yhteenveto tuloksista ja pohdintaa | 20 |
| | Lähteet | 22 |

Liitteet

Liite 1. TPGY:n koostumus

Lyhenteet

| | |
|---------|---|
| MPN | Most Probable Number. <i>Todennäköisyyteen perustuva metodi, jolla laske- taan kaikkein todennäköisin lukumäärä mikro-organismeja näytteessä.</i> |
| TPGY | Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast. <i>Elatusaine, joka koostuu tryptikaa- sista, peptonista, glukoosista ja hiivasta.</i> |
| LZ | Lysotsyymi. |
| SNARE | Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor. <i>Proteiiniryhmä, joka muun muassa osallistuu vesikkelien kulkeutumiseen.</i> |
| SNAP-25 | Synaptosomal nerve-associated protein 25. <i>Yksi proteiineista, joka kuuluu SNARE -ryhmään</i> |
| D-arvo | Decimal reduction time. <i>Kuvastaa bakteeri- tai itiöpopulaation lämmönkes- tävyyttä. Sillä tarkoitetaan aikaa, joka kuluu tietyssä lämpötilassa populaa- tion 90n laajuiseen tuhoamiseen.</i> |

1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia *Clostridium botulinum* ryhmän II itiöiden lämmönkestävyyttä kuumennuskokeilla ja Most Probable Number -menetelmää hyödyntäen. Työ tehtiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolla. Kuumennuskokeet luovat perustan tutkimukselle, jossa tutkitaan itiöiden germinaatiota, kasvua ja toksiinituotantoa jääkaappilämpötilassa erilaisten kuumennuskäsittelyiden jälkeen. Tässä työssä esiintyvät bakteerikantatiedot ovat salaisia, kunnes tutkimushanke päättyy ja tulokset julkaistaan yliopiston taholta. Bakteerikantatiedot esitetään tässä opinnäytetyössä nimillä kanta "A" ja kanta "B".

Nämä lämmönkestävyysskokeet ovat myös yksi osa-alue monivuotisessa tutkimushankkeessa, jonka tulosten pohjalta on tarkoitus muodostaa riskinarviointimalli *C. botulinum* -kasvun ja -toksiinituotannon riskistä sous vide -tuotteiden valmistuksessa. Sous vide -kypsennys on usein valmisruokateollisuudessa käytetty prosessimenetelmä, jossa elintarvike pakataan usein sellaisenaan tai esikäsiteltynä ilmatiiviiseen happea läpäisemättömään kalvopakkaukseen ja tämä pakkaus pastöroidaan 60–90 °C:n lämpötilassa vesihauteessa tai vesiautoklaavissa. Tällainen tuote säilyy jääkaappilämpötilassa viikosta useisiin viikkoihin [1, s. 285].

Valmisruokien prosessoinnissa suositellaan käyttämään yleistä 6D-mallia, jolla tarkoitetaan kuumennusprosessia tai eri prosessien yhdistelmää, jolla tuhotaan 10^6 nonproteolyttisen *C. botulinum* -itiötä [2, s. 559]. Käytännössä tämä usein toteutetaan kuumentamalla tuote 90 °C:ssa 10 minuutin ajan. Näin korkea lämpötila kuitenkin usein heikentää tuotteen aistinvaraista laatua. Näihin kokeisiin valituilla lämpötiloilla 75 °C, 78 °C, 82 °C ja 90 °C on tarkoitus auttaa löytämään optimaikalämpötilayhdistelmä elintarviketeollisuuden näkökulmasta, ja siinä otetaan huomioon muun muassa aistinvarainen laatu, energiankulutus ja tuotantokustannukset vaarantamatta elintarviketurvallisuutta.

2 *Clostridium botulinum*

2.1 Rakenne ja luokittelu

Clostridium botulinum on grampositiivinen, anaerobisissa olosuhteissa kasvava sauva-bakteeri, joka pystyy itiöimään ja tuottamaan botulinumneurotoksiinia. Kyseistä bakteeria esiintyy yleisesti maaperässä ja vesistöissä [3, s. 21;4, s. 103], mutta se tunnetaan ehkä paremmin sen toksiinista ja sen aiheuttamista ruokamyrkytystapauksista.

C. botulinum luokitellaan neljään eri ryhmään, I–IV, niiden fysiologisten ominaisuuksien perusteella, joita ovat esimerkiksi lämpötilavaatimukset ja proteiinien käyttö energianlähteenä. Ne ovat myös geneettisesti erilaisia ja ovat periaatteessa omia bakteerilajejaan. *C. botulinum* ryhmän I kannat ovat proteolyttisiä ja tuottavat toksiiintyyppisiä A, B ja F. Ryhmän I kannat kestävät korkeampia lämpötiloja, ja niiden optimikasvulämpötila on 37 °C. Niiden minimilämpötila, jossa itiöitä voi kasvaa, on noin 10 °C ja maksimilämpötila on 48 °C mutta kantojen välillä voi olla eroavaisuuksia. [1, s. 24;5, s.18].

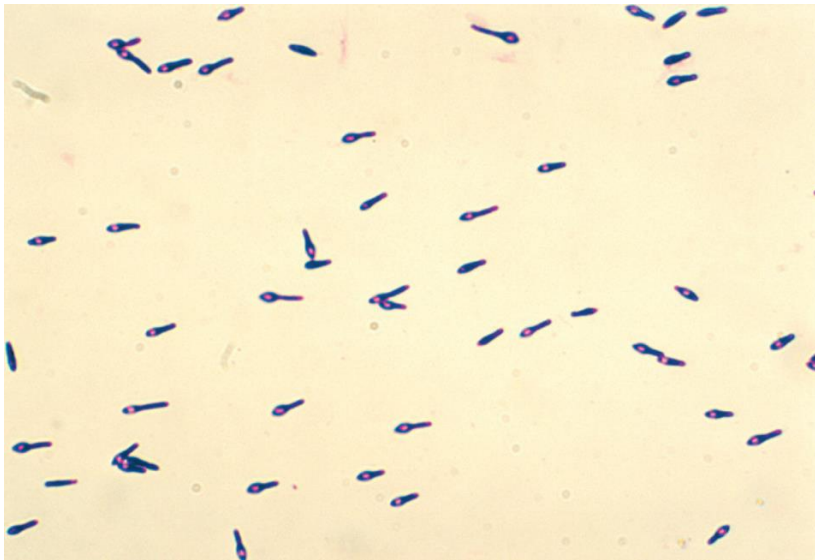
Ryhmän II kannat ovat nonproteolyttisiä ja tuottavat toksiiintyyppisiä B, E ja F. Molemmat ryhmän I ja II kannat aiheuttavat ihmisissä botulismia. Ryhmän II itiöt eivät kestä yhtä hyvin kuumuutta kuin ryhmän I itiöt, mutta ne sietävät paremmin kylmyyttä. Niiden optimikasvulämpötila on 26–30 °C, ja ne voivat kasvaa jopa 3 °C:ssa. Koska ryhmän II kannoilla on niin paljon geneettistä variaatiota eikä kaikkia tunneta hyvin, sen maksimikasvulämpötilaa ei ole pystytty määrittämään koko ryhmälle. [5, s. 18].

Ryhmän III kannat tuottavat tyyppin C- ja D-toksiineja, ja ne aiheuttavat botulismia eläimillä. Ryhmän III itiöiden optimikasvulämpötila on 40 °C ja vastaavasti kasvu heikkenee alle 15 °C:ssa [5, s. 18]. Ryhmän IV kannat tuottavat toksiiintyyppiä G, ja sen aiheuttamaa botulismia ihmisillä tai eläimillä ei ole raportoitu. [1, s. 24]. Ryhmän IV itiöiden optimikasvulämpötila on 37 °C [5, s. 18]. *C. botulinum*in lisäksi on löydetty bakteerilajit *Clostridium butyricum* ja *Clostridium baratii*, jotka myös tuottavat tyyppin E- ja F-toksiinia [1, s. 24].

2.2 Sporulaatio ja germinaatio

Bakteerin itiöinnistä käytetään usein myös termiä sporulaatio. Sporulaatio mahdollistaa bakteerin muuttumaan kestonuotoon, ja se auttaa bakteeria selviytymään haastavista olosuhteista. Bakteeri itiöi usein epäedullisissa olosuhteissa, esimerkiksi ravinnon puutteesta. [1,9-10]. Itiön rakenne on kapselimainen. Sen vesipitoisuus on erittäin alhainen verrattuna elävään vegetatiiviseen soluun. Se voi säilyä lepotilassa jopa vuosia. Itiön kuorikerros koostuu paksusta peptidoglykaanikerroksesta.

Sporulaatio alkaa vegetatiivisen emosolun sisällä. Näitä itiöinnin vaiheita on seitsemän I–VII, ja niiden luokittelu perustuu niiden morfologisiin ominaisuuksiin. Itiön sijoittuminen emosolun sisään on kullekin bakteerilajille tyypillistä, ja näitä muotoja käytetäänkin hyväksi muun muassa bakteerilajien tunnistamisessa. Solu, jonka sisällä itiö on emosolussa, kutsutaan sporangioksi (kuva 1). [1, s. 10].



Kuva 1. *C. botulinum* sporangioita [6, s. 44].

Germinaatio on tapahtuma, joka muuttaa itiön takaisin eläväksi vegetatiivisoluksi. Germinaatio aktivoivia tekijöitä on nähtävästi useita, mutta yksi tyypillisimpiä tekijöitä on kuumentaminen subletaalissa lämpötilassa, jolla tarkoitetaan lämpötilaa, joka edesauttaa germinaation käynnistymistä. Germinaatio aktivoi itiön lyyttiset entsyymit, joiden tehtävä on rikkoa itiön kuorta. Jos itiön omat lyyttiset entsyymit tuhoutuvat, germinaatiota ei voi tapahtua, ellei itiön ympäröivässä matriisissa ole lyyttisiä entsyymejä, kuten lysotsyymiä, jota esiintyy joissain elintarvikkeissa. [1, s. 10;1, s. 287].

2.3 Lämmönkestävyys

Bakteeri-itiöt kestävät huomattavasti korkeampia lämpötiloja kuin vegetatiiviset bakteerisolut niiden paksun kuorikerroksensa ja pienen vesipitoisuutensa ansiosta. Itiön tuhoamiseen vaaditaan siis hyvin korkeita lämpötiloja, 70–130 °C lajista riippuen. Näin korkeat lämpötilat kuitenkin voivat heikentää elintarviketuotteen aistinvaraista laatua, minkä vuoksi itiöiden täydellisen tuhoamisen sijaan turvaututaan usein germinaation ja kasvun estämiseen.

On huomattu, että aiemmin mainittu lysotsyymi lisää merkittävästi *C. botulinum* -itiön lämmönkestävyyttä, jolloin tarvitaan tehokkaampia lämpökäsittelyjä sellaisiin ruokiin, jotka sisältävät lysotsyymiä [7, s. 6019]. Jos esimerkiksi kuumennus tuhoaa itiön omat lyttiset entsyymit, joita tarvitaan itiön kuoren hajottamiseen, lysotsyymi pystyy korvaamaan ne ja näin mahdollistaa itiön germinoitumisen. Lysotsyymien lisäksi muita lämmönkestävyyteen vaikuttavia asioita ovat esimerkiksi matriisin rasva- ja proteiinipitoisuus [1, s. 293]. Myös eri kannoilla voi olla eroja lämmönkestävyydessä.

Esimerkiksi hetkellinen kuumennus voi aiheuttaa lämpöaktivaatioilmiön, jossa subletaalit lämpötilat voivat indusoida germinaatiota, mikä edesauttaa bakteerisolujen kasvua ja toksiini tuotantoa. Elintarviketeollisuudessa kylmäketjun katkeaminen voi luoda suotuisimmat olosuhteet germinaatiota ja kasvua ajatellen, mikä suurentaa ruokamyrkytyksen riskiä. On siis erittäin tärkeää, että tällaiset tuotteet, kuten valmisruoat, säilytetään aina viileässä.

Organismien lämmönkestävyydessä käytetään useita erilaisia termejä. Esimerkiksi D-arvolla kuvataan organismin lämmönkestävyyttä. Sillä tarkoitetaan aikaa, joka kuluu tietyssä lämpötilassa bakteeripopulaation 90 prosentin laajuiseen tuhoamiseen. Tämä tarkoittaa samaa kuin yhden kymmenlogaritmisen yksikön laajuista tuhoutumista, ja usein puhutaankin, kuinka monen 1D:n alenema populaatiossa on tapahtunut. Aiemmin mainittu 6D malli voidaan siis myös ilmoittaa 6D:n alenemana. D-arvo pystytään laskemaan alla olevan kaavan mukaisesti. [1, s. 287].

$$D = \frac{t}{\log a - \log b},$$

jossa a=itiöiden määrä alussa, b=itiöiden määrä kuumennusajan t jälkeen.

Mitä suurempi D-arvo, sitä pidempi kuumennusaika tietyssä lämpötilassa tarvitaan.

2.4 Botulinumneurotoksiini

2.4.1 Rakenne ja toiminta

Botulinumneurotoksiinin molekyyli rakenne koostuu raskaasta ja kevyestä ketjusta, jotka ovat kiinni toisissaan disulfididisidoksella [1, s. 26–27]. Raskas ketju on kooltaan noin 100 kDa, ja sen tehtävä on kiinnittyä synapsin membraanilla olevaan reseptoriin, jolloin kevyt ketju pääsee kuroutumaan synapsin sisään. Kevyt ketju on kooltaan noin puolet pienempi raskaasta ketjusta, eli noin 50 kDa, ja on toksiinin varsinainen vaikuttava osa. Se estää asetyylikoliinin vapautumisen synapsista, mikä estää hermoimpulssin kulun aiheuttaen velttohalvauksen. Kevyt ketju pilkkoo asetyylivesikkeleitä, jonka sisässä asetyylikoliini kulkeutuu, ja sulautuu synapsin membraaniin. Vesikkelien kulkeutumiseen osallistuu kolme eri SNARE-proteiinia: SNAP-25, synaptobreviini ja syntaksiini. Botulinumneurotoksiinityyppien luokittelu perustuu juuri näiden proteiinien estämiseen tyypinsä mukaisesti. [1, s. 27]. Toksiinia vapautuu *C. botulinum* -kasvuston logaritmisesta kasvunsa loppuvaiheesta ja mahdollisesti myös solun hajoamisessa [1, s. 26]. Botulinumneurotoksiini on maailman vahvin luonnollinen myrkky, ja niinkin pieni määrä kuin 30 ng toksiinia voi mahdollisesti johtaa kuolemaan [2, s. 556].

2.4.2 Toksiinin käyttö kauneudessa ja lääkehoidossa

Botulinumneurotoksiinin yleinen kauppanimi on botox, joka on puhdistettua ja vahvasti laimennettua toksiinityyppiä A [8]. Toksiinin kyky halvaannuttaa lihaksia hyödynnetään kosmeettisissa toimenpiteissä, usein kasvojen ryppyjen hävittämiseen. Botoxia käytetään myös joissain muissakin kliinisissä toimenpiteissä, kuten kainaloiden liihakiloilun hoitoon ja virtsarakon toimintahäiriöiden hoitoon tietyissä tapauksissa [9].

2.5 Botulismi

2.5.1 Botulismien eri muodot ja oireet

Botulismia esiintyy eri muodoissa, joista ehkä tunnetuin on klassinen botulismi, eli ruokamyrkytysbotulismi. Muita muotoja ovat haavabotulismi, imeväisiän botulismi, aikuisiän infektiivinen botulismi, inhalaatiobotulismi ja iatrogeeninen botulismi [1, s. 29]. Ruokamyrkytysbotulismi aiheutuu siitä, kun henkilö on syönyt botulinumneurotoksiinilla kontaminoitunutta ruokaa. Botulismien itämisaika on noin 12–72 tuntia ja sen vaihteluväli 2–14 tuntia. Botulismille tyypillisiä neurologisia oireita ovat pupillien laajentuminen, kaksoisnäky, suun kuivuminen ja lihashalvaus, jonka vuoksi nieleminen ja puhuminen vaikeutuu ja raajat veltostuvat. Myös pahoinvointia, oksentelua, väsymystä ja turvotusta voi esiintyä [8]. Taudin edetessä hengityselimet ja pallea paralysoituvat, mikä hoitamattomana johtaa kuolemaan. Botulismiin ei yleensä liity kuumeilua tai tajunnan menetystä [1, s. 29].

Imeväisiän botulismia esiintyy alle 1-vuotiailla, ja se on suolistoperäinen intoksikaatio. Näin nuorella lapsella ei usein ole kilpailevaa suolistobakteerikasvustoa, jolloin C. botulinum -itiöt voivat saada suotuisat olosuhteet germinaatiolle ja näin mahdollistaa itiöiden lisääntymisen ja toksiinituotannon. Itiöiden lähteitä ovat muun muassa hunaja ja ympäristön pöly, mutta usein niiden lähde jää epäselväksi [10, s. 9].

Haavabotulismissa bakteeri kulkeutuu avohaavaan, jonka hapettomat olosuhteet mahdollistavat itiön germinaation. Bakteerit pääsevät elimistöön esimerkiksi likaisen neulan välityksellä. Haavabotulismia tavataan usein ruiskuhuumeiden käyttäjillä. [10, s. 9].

Aikuisiän infektiivinen botulismi muistuttaa imeväisiän botulismia ja on harvinainen. Siinäkin itiöt pääsevät lisääntymään ja germinoitumaan suolistossa. Aikuisiän infektiivinen botulismi usein aiheutuu pitkäaikaisesta antimikrobilääkehoidosta [1, s. 30] tai suolistoleikkauksesta [10, s. 10], jotka häiritsevät suoliston normaalia kasvustoa.

Inhalaatiobotulismi on myös erittäin harvinainen botulismien muoto, jota on tavattu biologisten aseiden kehittelyn yhteydessä. Inhalaatiobotulismissa toksiinia pääsee suoraan elimistöön keuhkojen kautta [1, s. 30]. Iatrogeeninen botulismi on myös harvinainen

mutta kuitenkin yleistymässä oleva botulisman muoto. Tällainen botulismi saa usein alkunsa terapeuttisen tai kosmeettisen botulinumneurotoksiinihoidon yliannostuksesta [10, s. 10].

2.5.2 Yleisyys, hoito, ehkäisy

Botulismi on melko harvinainen sairaus [8]. Suomessa yksittäisillä ihmisillä todettua botulismia on ilmennyt vuosina 1999, 2006, 2009 ja 2011 [11]. Eläimillä Suomessa on todettu botulismia ainakin vuosina 2002, jolloin suuri määrä tarhattuja sinikettuja kuoli pilaantuneen rehun vuoksi [12]. *C. botulinum* -ryhmän I aiheuttamat ruokamyrkytystapaukset on usein linkitetty säilykeruokiin, kun taas ryhmän II aiheuttamat ruokamyrkytystapaukset on usein linkitetty kalaruokiin [2, s. 557]. Euroopassa aiheutuneet epidemiat ovat usein liittyneet ryhmän II tuottamaan toksiinityyppiin B, ja myrkytys on usein saatu savustetusta ja kuivatetusta kalasta sekä säilykevihanneksista [2, s. 557].

Mitä nopeammin botulismiin sairastunut henkilö pääsee hoitoon, sitä parempi todennäköisyys on selviytyä myrkytyksestä. Botulisman alkuoireet voivat usein muistuttaa muita sairauksia, jolloin sairaus voidaan aluksi diagnosoida väärin, ja näin sairaus jatkaa pahenemistaan. Botulismia hoidetaan antitoksiinilla, ja jälkihoitoon usein liittyy fyysinen kuntoutuminen, joka voi kestää useista viikoista useisiin kuukausiin. Antibiootteja ei tarvita, muulloin kuin haavabotulismissa. Botulismia vastaan on olemassa rokote, mutta se ei ole yleisesti käytössä, sillä sen tehokkuudesta ei ole tarpeeksi tietoa. [8].

Botulismi diagnosoidaan osoittamalla botulinumneurotoksiini potilasnäytteestä, joka voi olla seerumi, uloste tai haavaerite, sekä epäillyistä toksiinin lähteistä [13]. Botulinumneurotoksiini pystytään määrittämään erilaisilla menetelmillä, mutta ainoa standardisoitu menetelmä toksiinin määrittämiseen perustuu menetelmään, jossa tehdään eläinkokeita hiirillä [14, s. 9].

Ruokamyrkytyksen aiheuttaman botulisman ehkäisyyn hygieenisuus ja ruoan oikeaoppinen prosessointi ovat olennaisia tekijöitä. Tyypillisimmät kuumennuskäsittelyt itiöiden tuhoamiseen ovat niin kutsutut 12D- ja 6D-käsittelyt, jotka tuhoavat 10^{12} ja 10^6 itiötä. 12D-käsittelyä käytetään usein säilykeruoissa ja 6D-käsittelyä käytetään usein kylmässä säi-

lytettäville valmisruoille. Itiöiden lisäksi myös botulinumneurotoksiini voidaan tuhota kuumennamalla. On myös huolehdittava, ettei elintarvikkeen kylmäketju pääse katkeamaan, sillä se voi aktivoida *C. botulinum* itiöiden germinaation, mikä voi johtaa botulinumneurotoksiinin tuotantoon. Toksiinin tuotannon estämiseen voidaan käyttää myös muita keinoja, kuten nostamalla elintarvikkeen happamuutta tai suolapitoisuutta, ja lisäämällä nitriittiä. [1, s. 32].

3 Kokeellinen osuus

C. botulinum ryhmän II itiöiden kuumennuskokeet tehtiin ajanjaksolla 18.2.–5.4.2019. Tarkoituksena oli tutkia valittujen kantojen lämmönkestävyyttä valituissa lämpötiloissa sekä lysotsyymien vaikutusta itiöihin kuumennuskokeilla ja MPN-menetelmää hyödyntäen. Lisäksi haluttiin tutkia kantojen välistä eroa.

3.1 Näytteiden valmistus ja kuumennus

Kaikissa kuumennuskokeissa näytteinä toimi kantakohtainen itiösuspensio. Jokaista näytettä kohden tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä niin sanotuille pre- ja post-putkille, joihin itiösuspensio laimennettiin 1:10 TPGY:hyn. TPGY:n koostumus löytyy liitteistä (liite 1). Post-putkia pidettiin viileänä jäissä ennen ja jälkeen kuumennuksen itiöiden germinaation välttämiseksi. Post-putket kuumennettiin 75-90 °C:ssa vesihauteessa halutun ajan kokeesta riippuen. Pre-putket jätettiin odottamaan anaerobikaappiin kuumennuksen ajaksi. Näissä kokeissa käytettiin kahta erimallista Don Whitley Scientificin anaerobikaappia: MG500 ja MG1000, molemmat ilmalukoilla, ja niiden kaasukoostumus oli 85 % typpeä, 10 % hiilidioksidia ja 5 % vetyä. Post-näytteiden lämpötilaa seurattiin Thermocouple ThermaData® Loggers type K (ETI Ltd.) -mallisella lämpötilaloggerilla, jonka anturit olivat inokuloimattomissa TPGY:tä sisältävissä koeputkissa. Ennen kuumennusta nämä koeputket jäähdytettiin vastaamaan post-putkien lämpötilaa, jotta kuumennuksen seuraaminen olisi mahdollisimman todenmukainen. Kun putket laitettiin kuumavesihauteeseen ja lämpötila saavutti 65 °C, käynnistettiin ajastin, johon oli asetettu haluttu kuumennusaika. Kuumennuksen jälkeen post-näytteet shokkijäähdytettiin jäävesihauteessa

lähelle 0 °C:ta. Lämpötilaloggerin tietoja hyödyntämällä laskettiin toteutunut kuumenusaika, jossa otettiin huomioon lämpökertymä. Lämpötilaloggerin data käsiteltiin sen käyttöohjelmalla ThermaData® Studio Software.

Seuraavaksi pre- ja post-putkien näytteet laimennettiin 96-kuoppalevyille pipetoimalla 30 µl näytettä 270 µl:aan elatusainetta ilman lysotsyymiä. Jos kokeessa käytettiin lysotsyymiä (50 mg/ml), se lisättiin ja laimennettiin elatusaineseen ennen sen pipetoimista kuoppalevyille niin, että lysotsyymien loppupitoisuudeksi tuli 10 µg/ml. Kuoppalevyn ensimmäisen rivin laimennos on pre-näytteillä 10^{-2} ja post-näytteillä 10^{-1} , mikä on otettava huomioon MPN-laskuissa. Jos kokeessa käytettiin lysotsyymiä, sitä lisättiin vielä post-putkiin laimentamalla lysotsyymi ensin 1:50 TPGY:hyn, ja tätä laimennosta pipetoitiin 48 µl post-putkiin. Kuoppalevyt, jätettiin anaerobikaappiin inkuboitumaan vähintään kahdeksi päiväksi 30 °C:n lämpötilaan ennen tulosten tarkastelua.

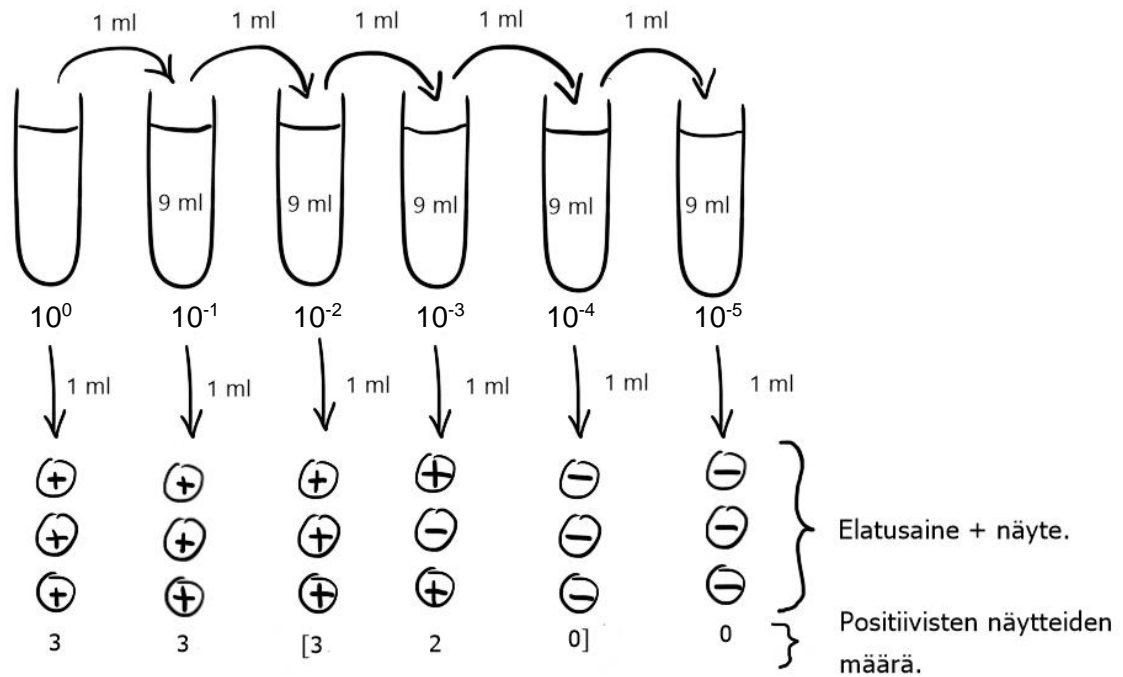
3.2 MPN-menetelmä

MPN-menetelmä on erityisesti elintarviketeollisuudessa suosittu menetelmä [15], jonka avulla arvioidaan bakteerien määrä näytteessä. Kasvun havaitseminen tapahtuu visuaalisesti; esimerkiksi näissä kokeissa samea väri tarkoitti kasvua ja kirkas väri tarkoitti, ettei kasvua ollut. Yhdestä näytteestä yleisimmin tehdään joko kolme, viisi tai jopa kymmenen rinnakkaislaimennussarjaa. Laimennosten antamien tulosten perusteella saadaan niin sanottu MPN-luku, jonka avulla katsotaan MPN-taulukosta lukuarvo, joka kertoo kaikkein todennäköisimmän bakteerien lukumäärän yhdessä millilitrassa.

Tässä työssä käytettiin kolmen rinnakkaislaimennussarjan MPN-menetelmää, ja siten myös MPN-luku koostuu kolmesta numerosta. Numerot katsotaan laimennossarjan siitä kohdasta, missä itiöt tuhoutuvat (kuva 2). Menetelmä ei toimi tai ei ole luotettava, jos kaikki laimennokset ovat positiivisia. Numerot voivat olla 0-3, riippuen positiivisten ja negatiivisten tulosten määrästä. Tässä työssä käytetty MPN-taulukko [15] käyttää 95 %:n luottamustasoa.

Menetelmä olettaa, että näytteen organismit ovat jakautuneet täydellisen tasaisesti, mikä todellisuudessa on mahdotonta. Menetelmä myös olettaa, että yhdenkin organismin

läsnä ollessa näytteessä näkyy kasvua. Menetelmä ei kuitenkaan ota huomioon mahdollista kontaminaatiota. MPN-menetelmän sopii erityisesti pieniin pitoisuuksiin ja onkin niissä sensitiivisempi vaihtoehto suoraan petrimaljoista laskemiselle. [16].

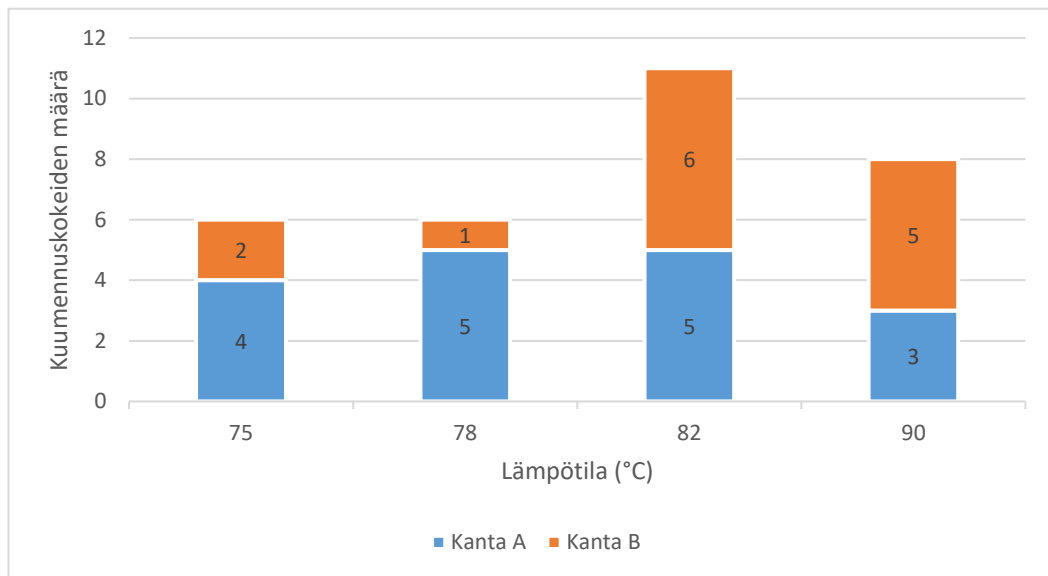


Kuva 2. MPN-luvun määrittäminen laimennossarjasta.

4 Tulokset

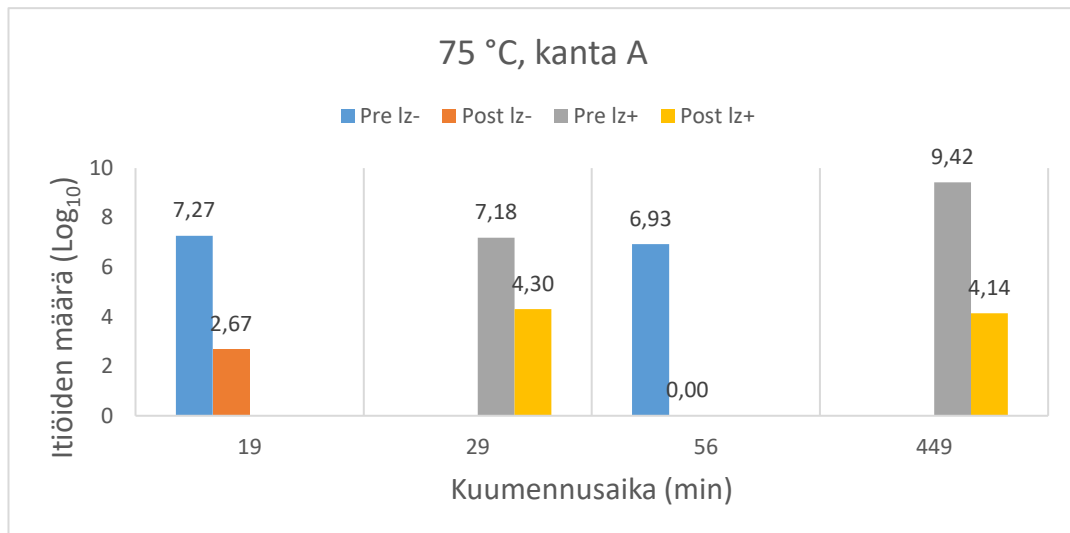
Tätä opinnäytetyötä varten kuumennuskokeita tehtiin yhteensä 31, joista 17 on tehty kannalla A ja 14 kannalla B. Kokeiden määrä lämpötilojen mukaan lajiteltuna näkyy kuvassa 3. Jokaista koetta kohden tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä ja niiden keskiarvoa käytettiin havainnollistamaan tuloksia kuvissa 4-16. Todellisuudessa näitä kuumennuskokeita on jo tehty aiemmin tässä projektissa ja niiden tekeminen jatkuu tämän opinnäytetyön jälkeenkin, mutta näissä tulosten tarkastelussa keskitytään vain tätä opinnäytetyötä varten tehtyihin kokeisiin. Näitä tuloksia tullaan hyödyntämään tässä tutkimushankkeessa.

Näissä tuloksissa puhutaan toisinaan itiöiden tuhoutumisesta, vaikka todellisuudessa ne voivat olla vain inaktivoituneita. Kuumennus on voinut inaktivoida itiöiden germinaatiomekanismin, jolloin itiö ei pysty germinoitumaan ja muuttumaan takaisin toksiinia tuottavaksi vegetatiivisoluksi, ellei jokin, kuten lysotsyymi, korvaa inaktivoitunutta germinaatiomekanismia. Sitä, onko kuumennus esimerkiksi aiheuttanut vaurioita itiön rakenteessa, vai onko sen germinaatiomekanismi inaktivoitunut, ei voida päätellä näistä tuloksista. Niistä kuitenkin nähdään, miten lysotsyymi on vaikuttanut itiöiden lämmönkestävyyteen ja miten eriaisteiset ja -pituiset kuumennukset vaikuttavat itiöpopulaation tuhoutumiseen.



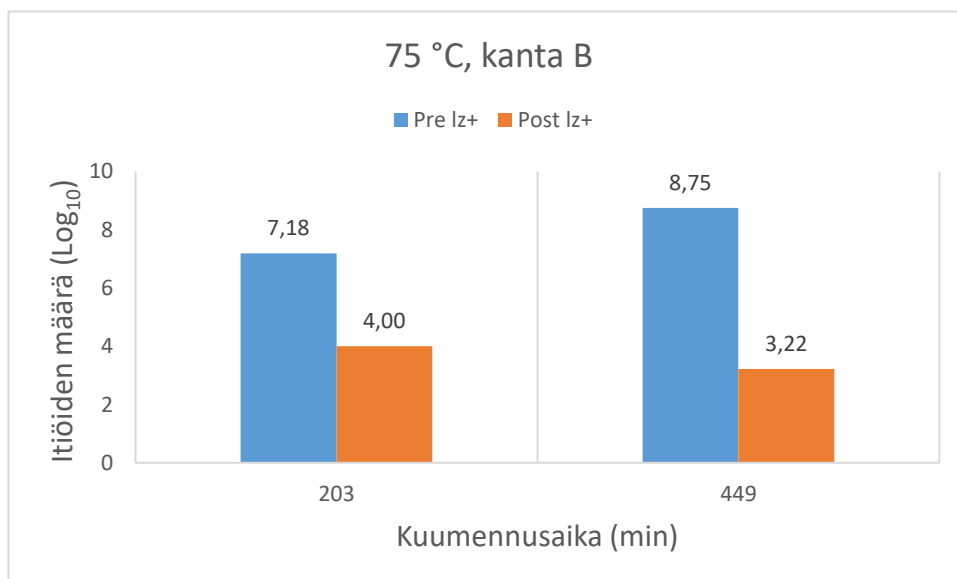
Kuva 3. Kuumennuskokeiden määrä esitettynä lämpötiloittain ja kannoittain.

Kuten jo mainittiin, lysotsyymien vaikutus lämmönkestävyyteen on selvästi havaittavissa kaikissa kokeissa, joihin lysotsyymiä lisättiin. Vaikutuksen huomaa vertaamalla keskenään kuumennuskokeita ilman lysotsyymiä ja lysotsyymien kanssa. Lysotsyymien läsnä ollessa itiöiden inaktivoitumiseen vaaditaan samassa lämpötilassa pidempiä aikoja verrattuna tilanteeseen, jossa lysotsyymiä ei ole. Esimerkiksi A-kannan 75 °C:n ja 56 minuutin kuumennus ilman lysotsyymiä on inaktivoinut kaikki itiöt, kun taas 449 minuutin kuumennuksessa lysotsyymien kanssa melkein puolet lähtöpopulaatiosta on selviytynyt (kuva 4).



Kuva 4. A-kannan tulokset lämpötilassa 75 °C.

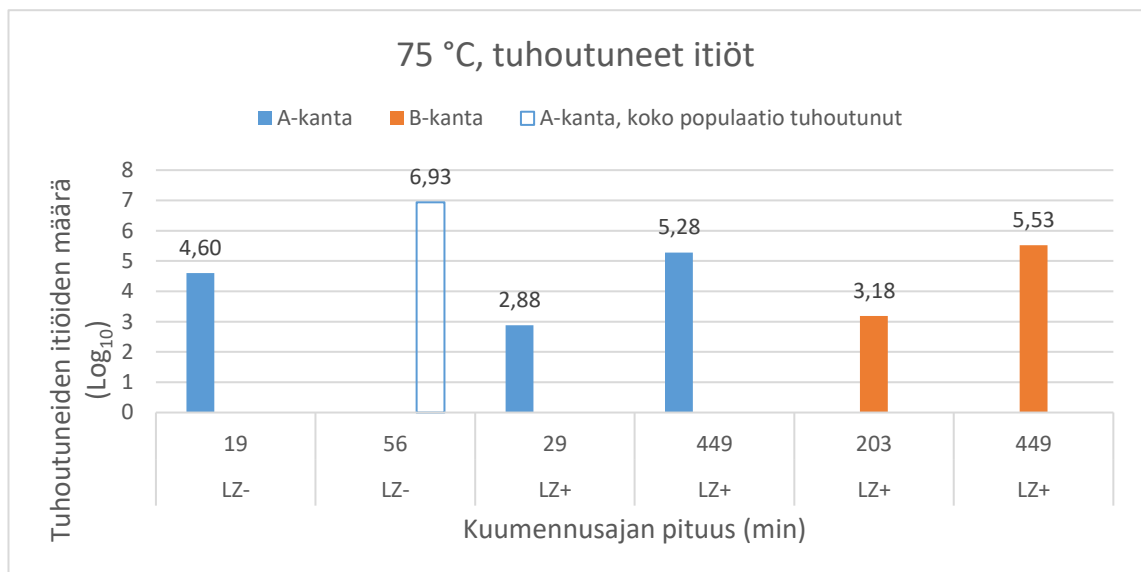
Kannalla B tehtiin vain kaksi kuumennusta 75 °C:n lämpötilassa (kuva 5) ja molemmissa kokeissa käytettiin lysotsyymiä. Näistä toisessa 203 minuutin kuumennuksessa itiöitä tuhoutui hieman alle puolet ja toisessa 449 minuutin kuumennuksessa tuhoutui hieman yli puolet itiöistä.



Kuva 5. Kannan B tulokset lämpötilassa 75 °C.

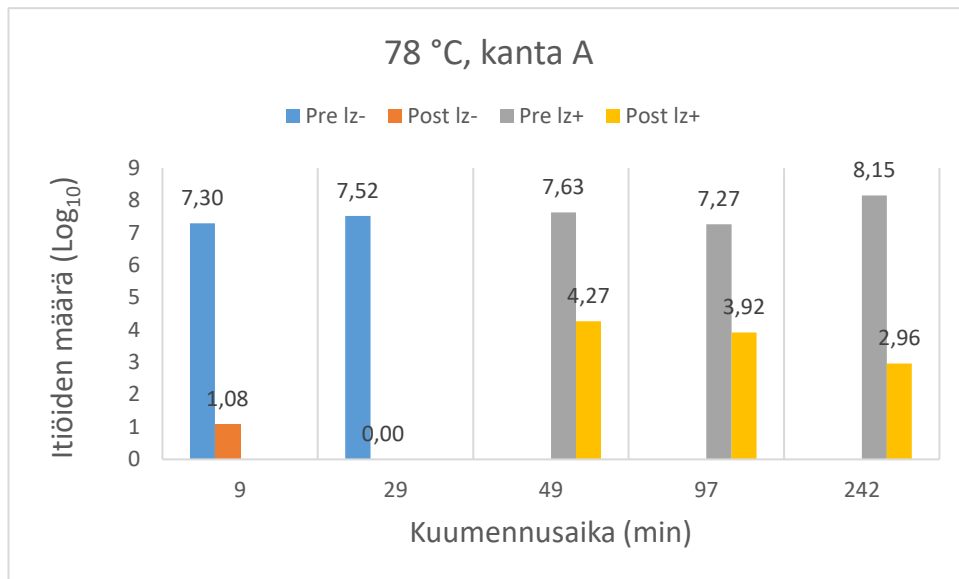
Näyttäisi siltä, että molemmissa kannoissa itiöiden tuhoutuminen on ollut saman suuruista 449 minuutin kuumennuksissa lysotsyymien kanssa eikä siten huomattavaa eroavaisuutta kantojen välillä näy tässä vaiheessa (kuva 6). Voisi myös olettaa, että 75 °C:ssa

vaadittaisiin molemmissa kannoissa runsaasti pidemmät kuumennusajat lysotsyymin kanssa, jotta kaikki itiöt tuhoutuisivat.



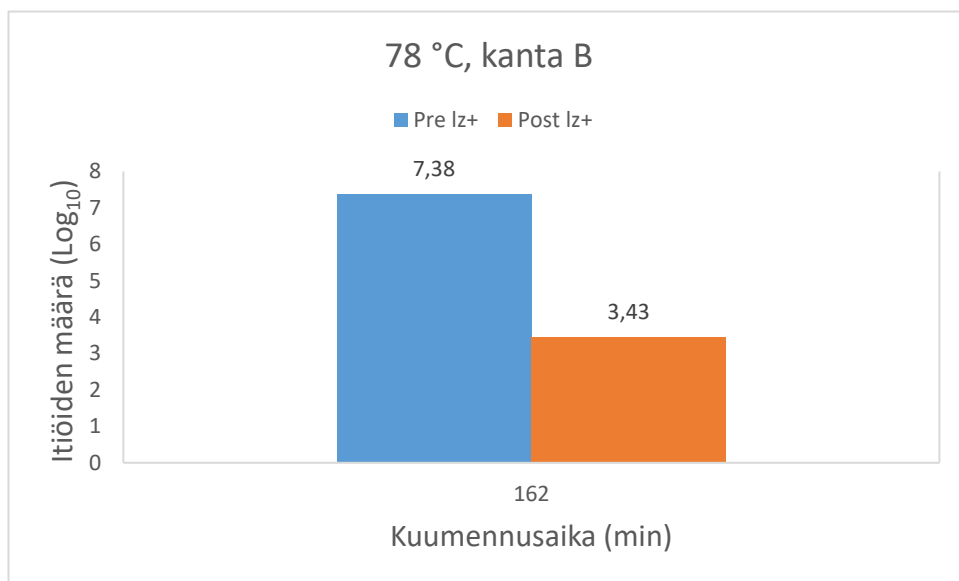
Kuva 6. Kantojen A ja B tuhoutuneiden itiöiden määrä lämpötilassa 75 °C.

Kanta A:n 78 °C:n tulokset näkyvät kuvassa 7. Yhdeksän minuutin kuumennus ilman lysotsyymiä ei aivan riittänyt tuhoamaan kaikkia itiötä, kun taas 29 minuutin kuumennus riitti tuhoamaan kaikki itiöt. Molemmat 49 ja 97 minuutin kuumennukset lysotsyymin kanssa aiheuttivat lähes saman suuruisen aleneman, vaikka kuumennusajan ero on melkein kaksinkertainen. Tässäkin vasta pisimmässä 242 minuutin kuumennuksessa on huomattavaa eroa itiöiden tuhoutumisen määrässä.



Kuva 7. A-kannan tulokset lämpötilassa 78 °C.

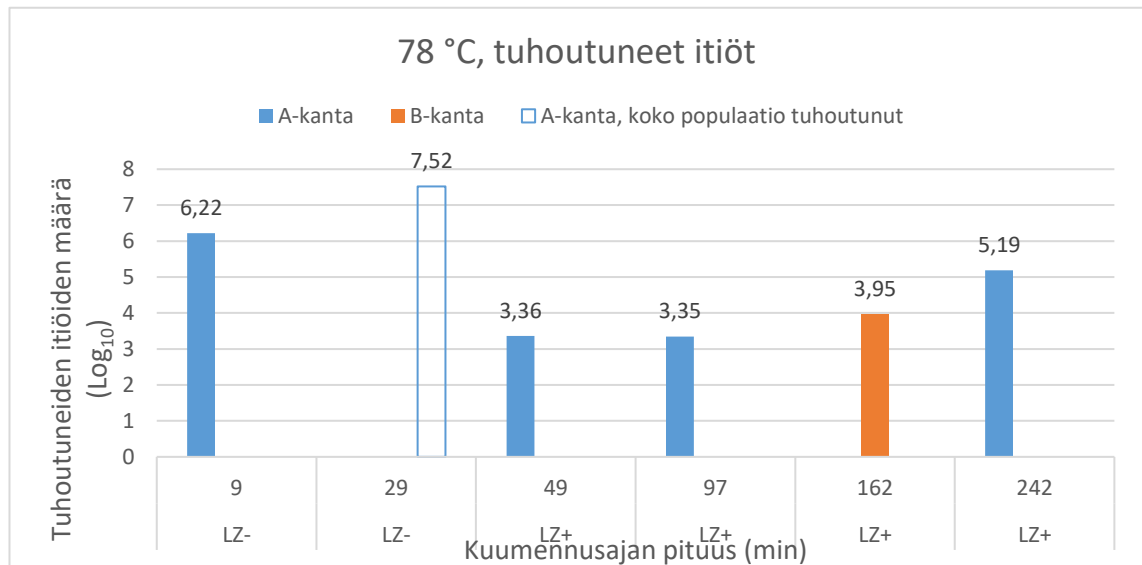
Kannalla B tehtiin vain yksi kuumennus 78 °C:ssa (kuva 8), eikä se ole juurikaan vertailtavissa minkään A-kannan kokeen kanssa, joten kantojen välistä eroa on vaikea havaita. Siitä kuitenkin myös nähdään lysotsyymiin vaikutus itiöiden lämmönkestävyyteen.



Kuva 8. Kannan B tulokset lämpötilassa 78 °C.

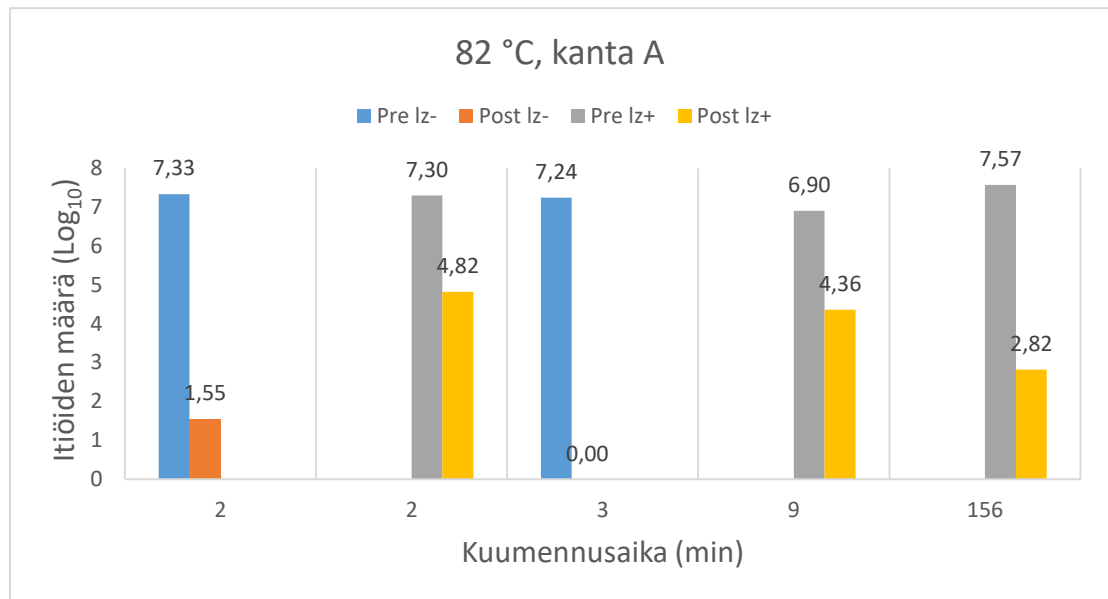
78 °C:n lämpötilassa tehdyissä kokeissa tuhoutuminen on ollut hieman korkeampaa kuin 75 °C:ssa. Esimerkiksi 75 °C:n lämpötilan ja 19 minuutin kuumennus ilman lysotsyymiä on inaktivoinut lähtöpopulaatiosta noin 4,60 logaritmisien yksikön verran itiöitä, kun jo

kolmen asteen korkeammassa 78 °C:n ja 9 minuutin kuumennuksessa ilman lysotsyymiä on inaktivoinut lähtöpopulaatiosta noin 6,22 logaritmisen yksikön verran itiöitä (kuva 9).



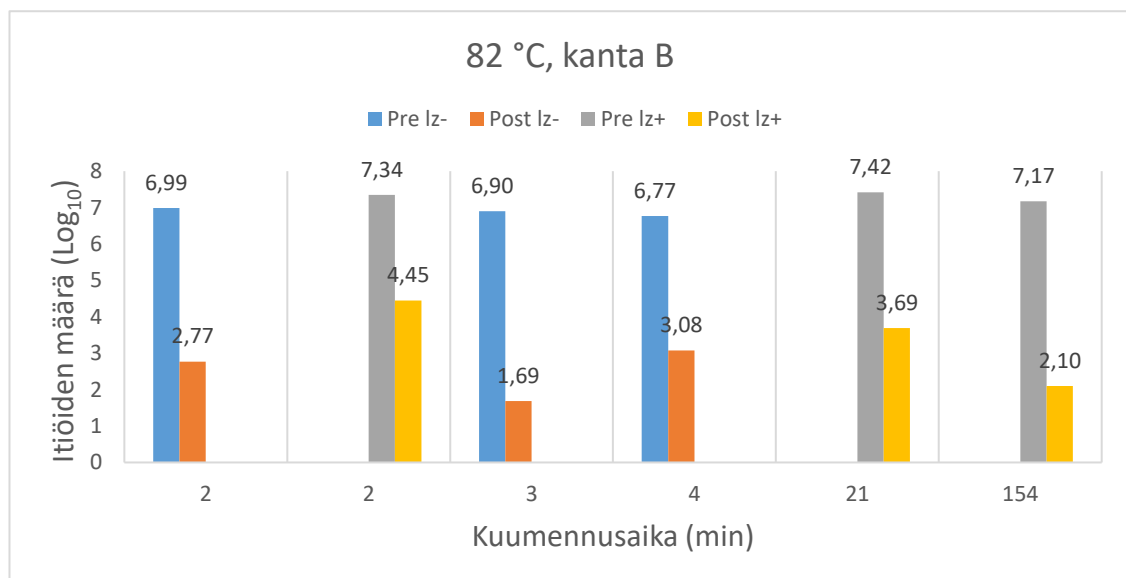
Kuva 9. Kantojen A ja B tuhoutuneiden itiöiden määrä lämpötilassa 78 °C.

82 °C:n lämpötilassa tehdyissä A-kannan kokeissa (kuva 10) ilman lysotsyymiä tuhoutuivat kaikki itiöt 3 minuutin kuumennuksessa ja suurin osa 2 minuutin kokeessa. 2 minuutin kokeessa, jossa käytettiin lysotsyymiä, tuhoutui vain alle puolet itiöistä. Alle puolet itiöistä tuhoutui myös 10 minuutin kuumennuksessa ja hieman yli puolet 150 minuutin kuumennuksessa. On melko huomattavaa, kuinka vain yhden minuutin lisääminen kuumennusaikaan vaikuttaa itiöpopulaation tuhoutumiseen ilman lysotsyymien läsnäoloa. Sen sijaan lysotsyymien kanssa vaaditaan taas huomattavasti pidempi kuumennusaika, jotta tuhoutumisen määrässä nähdään selvää eroa.



Kuva 10. A-kannan tulokset lämpötilassa 82 °C.

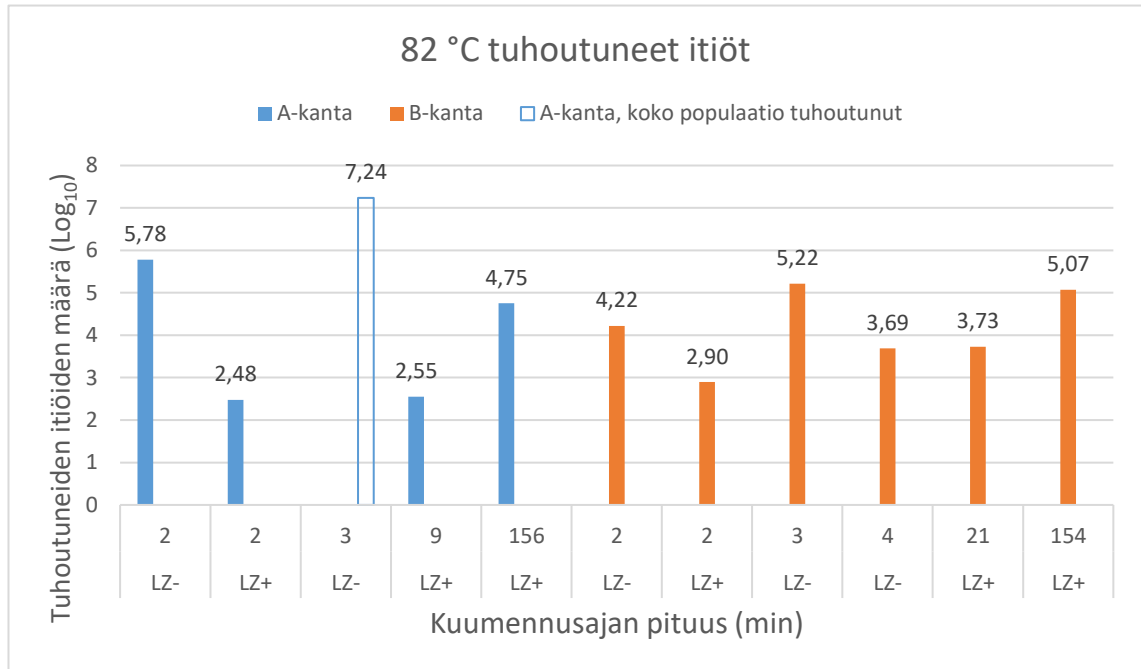
Kannan B tulosten (kuva 11) perusteella itiöt ovat kestäneet paremmin lämpöä 82 °C:ssa kuin kannan A itiöt. Tämä näkyy kuitenkin vain niissä tuloksissa, joissa ei ole lysotsyymiä, esimerkiksi kahden minuutin kuumennuksissa ilman lysotsyymiä B-kannan itiöpopulaatiossa tapahtui noin 4,22:n vähenemä, kun taas A-kannan itiöissä tapahtui noin 5,78:n vähenemä.



Kuva 11. B-kannan tulokset lämpötilassa 82 °C.

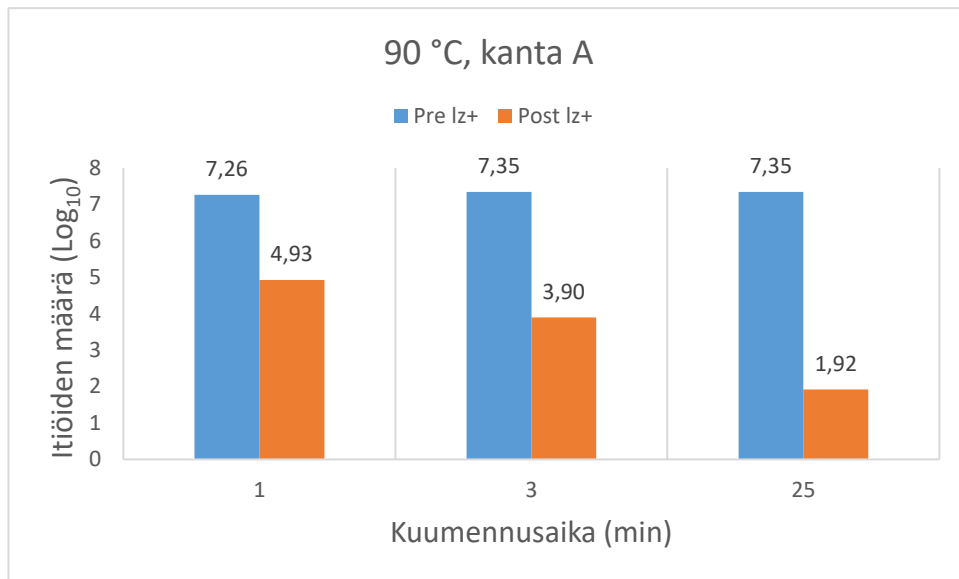
Samanlaista eroa nähdään myös kolmen minuutin kuumennuksissa. Toisaalta kahden minuutin kuumennuksissa lysotsyymien kanssa B-kannan itiöitä on tuhoutunut hieman

enemmän sekä 154 minuutin kuumennuksessa on tuhoutunut hieman enemmän kuin A-kannan 156 minuutin kuumennuksessa. Erot eivät kuitenkaan näyttäisi olevan suuria (kuva 12).



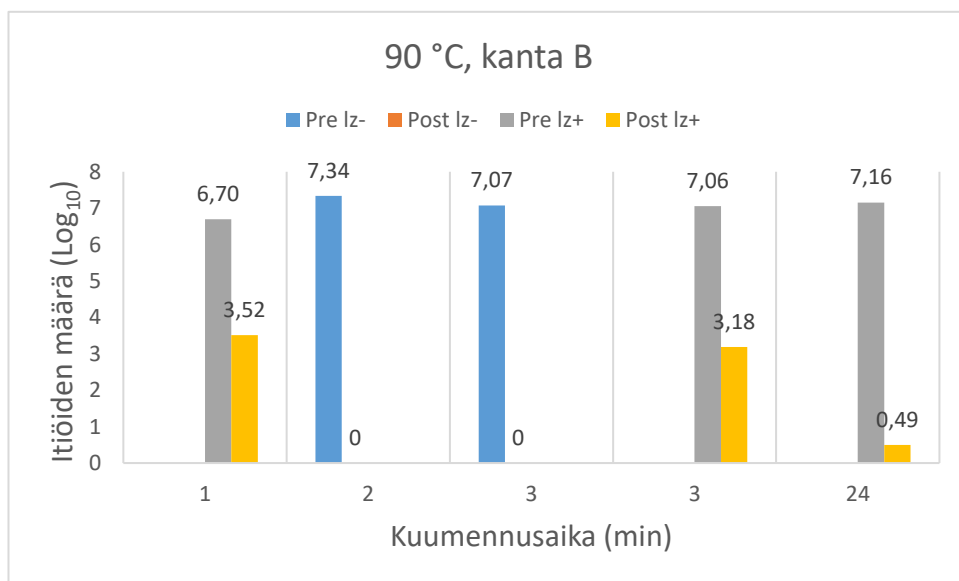
Kuva 12. Kantojen A ja B tuhoutuneiden itiöiden määrä lämpötilassa 82 °C.

90 °C:ssa tehtiin kolme kuumennuskoetta kannalla A ja kaikki tehtiin lysotsyymien kanssa (kuva 13). Kolmen minuutin kuumennuksessa suunnilleen puolet itiöistä tuhoutui, ja 25 minuutin tuloksissa taas reilusti yli puolet itiöistä tuhoutui.



Kuva 13. A-kannan tulokset lämpötilassa 90 °C.

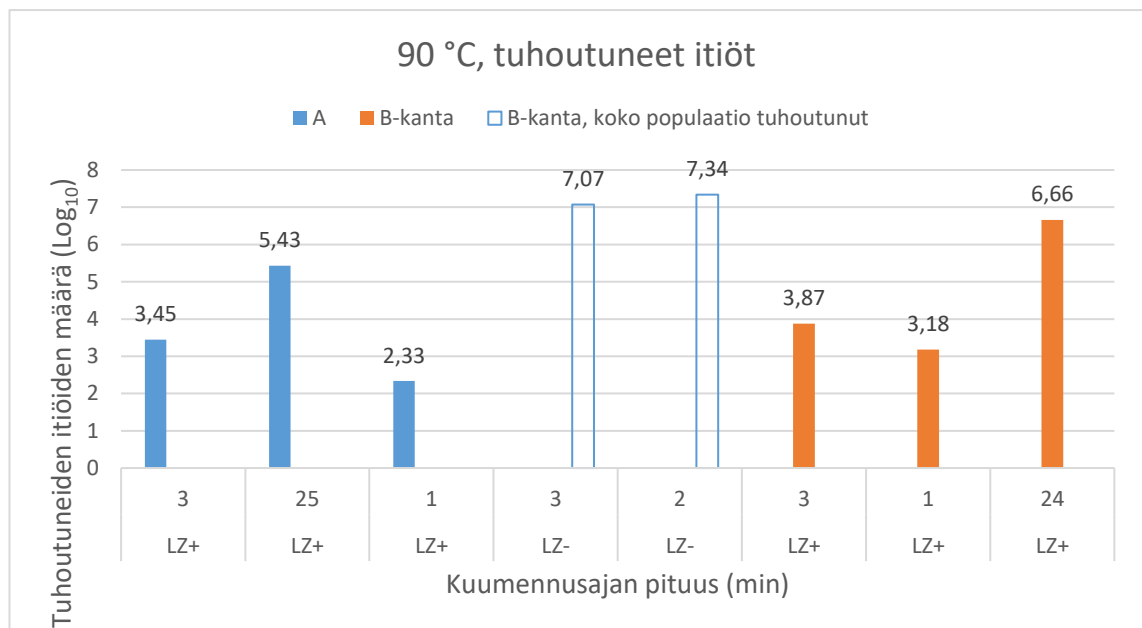
B-kannan 90 °C:n kuumennuksissa ilman lysotsyymiä (kuva 14) tuhoutuivat kaikki itiöt 2 ja 3 minuutissa. Lysotsyymillä yhdessä 1 ja 3 minuutin kuumennuksissa noin puolet itiöistä tuhoutui. 24 minuutin kuumennuksessa lysotsyymillä yhdessä tuhoutuivat lähes kaikki itiöt.



Kuva 14. B-kannan tulokset lämpötilassa 90 °C.

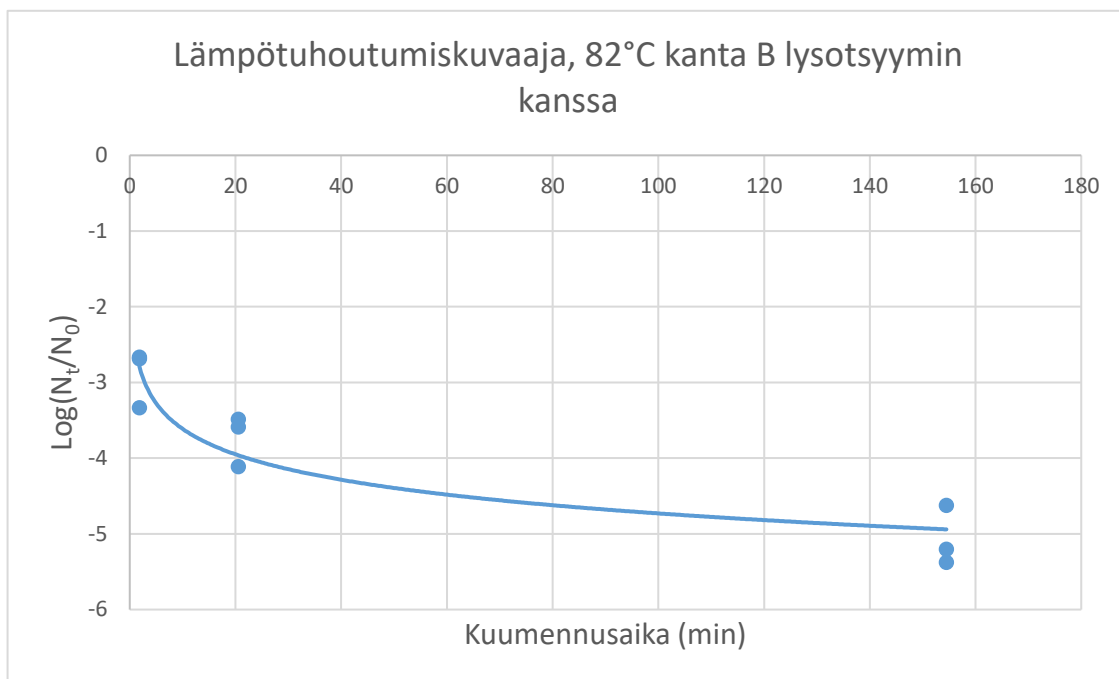
Kun tarkastellaan kantojen eroja kuvaajasta 15, huomataan, että kannan B itiöitä on tuhoutunut enemmän kuin A-kannan itiöitä, esimerkiksi yhden minuutin kuumennuksissa lysotsyymillä yhdessä B-kannan itiöitä on tuhoutunut yhden logaritmisuorituksen yksikön verran enemmän kuin A-kannan itiöitä, ja suunnilleen saman verran on tuhoutunut B-kannan 24

minuutin kuumennuksessa verrattaessa A-kannan 25 minuutin kuumennukseen. Toisaalta molempien kantojen kolmen minuutin kuumennuksissa ei näy paljon eroa.



Kuva 15. Kantojen A ja B tuhoutuneiden itiöiden määrä lämpötilassa 90 °C.

Bakteeripopulaation sekä bakteeri-itiöpopulaation tuhoutumista kuvataan usein lämpötuhoutumiskuvaajalla (kuva 16). Joissain lämpötuhoutumiskäyrissä, etenkin Itiöpopulaatioiden lämpötuhoutumisessa, voidaan huomata niin sanottu tailing-efekti, jolla tarkoitetaan sitä, että pieni osa itiöistä ovat huomattavasti kestävämpiä kuin suurin osa populaatiosta ja näin lämpötuhoutuminen alkaa hidastua ja käyrään muodostuu ”häntä” [1, s. 288]. Lisäksi joissain kuvaajissa voidaan havaita niin sanottu ”hartia”, jos on tarpeeksi mittauspisteitä. Tällä ilmiöllä tarkoitetaan viivevaihetta ennen tuhoutumisen alkua, ja se näkyy tuhoutumiskäyrän alussa lyhyenä patkänä, jossa tuhoutumista ei tapahdu lainkaan. Koska näissä kokeissa mittauspisteitä on niin vähän, lämpötilatuhoutumiskäyrien sijaan tuhoutuminen on esitetty pylväsdiagrammeihin.



Kuva 16. Lämpötuhoutumiskuvaaja lämpötilassa 82 °C, kanta B lysotsyymin kanssa. Käyrässä ei näy hartiaa. Kuvaajan loppupään pisteistä kuitenkin erottuu "häntä".

5 Yhteenveto tuloksista ja pohdintaa

Yleisesti tuloksista voidaan todeta, että pidemmissä kuumennuksissa ja korkeammissa lämpötiloissa tuhoutuminen on tehokkaampaa molemmilla kannoilla, mikä oli odotettavissa. Matalimmissa lämpötiloissa vaaditaan huomattavasti pidemmät kuumennusajat, jotta saavutettaisiin suunnilleen samansuuruisen tuhoutumisen kuin korkeammissa lämpötiloissa. Esimerkiksi 75 °C:n B-kannan 203 minuutin kuumennus lysotsyymin kanssa inaktivoi itiöitä lähtöpopulaatiosta 3,18 logaritmisen yksikön verran ja 82 °C:n lämpötilassa noin sama määrä itiöitä inaktivoituu 21 minuutissa ja 90 °C:ssa riittää noin yksi minuutti.

Kantojen välillä ei näy dramaattista eroa näiden tulosten perusteella. 82 °C:n lämpötilan tuloksissa näyttäisi siltä, että B-kanta sietää paremmin lämpöä kuin kanta A, ainakin ilman lysotsyymiä. Mutta 90 °C:ssa näyttäisi siltä, että A-kanta sietäisi paremmin kuumuutta kuin B-kanta. Mutta koska 90 °C on jo paljon korkeampi lämpötila kuin 82 °C, näiden havaintojen puitteissa voisi olettaa, että kanta A sietää paremmin korkeampia lämpötiloja kuin B-kanta ja vastaavasti kanta B sietää paremmin alempia lämpötiloja.

Nämä tulokset ovat lähinnä suuntaa antavia. Jotta saataisiin vahvempia perusteita päätelmiin, tarvittaisiin enemmän mittauspisteitä. Lisäksi on hyvä huomioida itiönäytteiden pitoisuus, joka saattaa vaihdella. Todellisuudessa kuumennuskokeita on enemmän ja niitä tehdään vielä lisää, joten todennäköisesti näistä tuloksista voidaan tehdä enemmän päätelmiä, kun kaikki tarvittava data on koottu yhteen.

Lähteet

- 1 Korkeala, Hannu. 2007. Elintarvikehygieniä, ympäristöhygieniä, elintarvike- ja ympäristötoksikologia. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.
- 2 Peck, M. 2006. Clostridium botulinum and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? Journal of Applied Microbiology. Vol. 101, s. 556-570.
- 3 Hauschild, Andreas & Karen, Dodds. 1992. Clostridium botulinum, Ecology and Control in Foods. Marckel Dekker, Inc.
- 4 Lindström, Miia; Fredriksson-Ahomaa, Maria; Korkeala, Hannu. 2009. Molecular epidemiology of group I and II *Clostridium botulinum*. Teoksessa Brüggemann H; Gottschalk G (ed.). *Clostridia: Molecular Biology in the Post-genomic Era*, s. 103–130. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- 5 Derman, Yağmur. 2015. Stress Response of Group I and II *Clostridium botulinum*. Helsinki: Unigrafia.
- 6 Mishra, Saroj & Dipti, Agrawal. 2016. A Concise Manual of Pathogenic Microbiology. E-kirja. John Wiley & Sons, Inc.
- 7 Wachnicka, Eerlina; Stringer, Sandra; Barker, Gary; Peck, Michael. 2016. Systematic Assessment of Nonproteolytic Clostridium botulinum Spores for Heat Resistance. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 82, s. 6019–6029.
- 8 Botulism. Verkkoaineisto. World Health Organization. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>> 10.1.2018. Luettu 8.4.2019.
- 9 Lääketietokeskus. Botox. Verkkoaineisto. Terveyskirjasto. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_teos=far&p_artikkeli=far00132>. Luettu 11.4.2019.
- 10 Jalava, Katri; Lindström, Miia; Sormunen, Pertti; Ruotsalainen, Eeva; Pihlajasaari, Annika; Korkeala, Hannu; Timonen, Suvi; Lyytikäinen, Outi; Kuusi, Markku. 2014. Toimenpideohje botulismitapausten varalta. Verkkoaineisto. Julkari. Terveysten ja Hyvinvoinnin Laitos. <https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/116242/THL_OHJ8_2014_web_Korjattu2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Luettu 29.4.2019.
- 11 Botulismi. Verkkoaineisto. Terveysten ja Hyvinvoinnin Laitos. <<https://thl.fi/fi/web/infektiaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/botulismi>>. Luettu 8.4.2019.
- 12 Botulismi. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/teemat/zoonosikeskus/zoonosivit/bakteerien-aiheuttamat-taudit/botulismi/>>. Luettu 9.4.2019.

- 13 Clostridium botulinum ja botulismien ehkäisy. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/clostridium-botulinum/>>. Luettu 1.4.2019.
- 14 Lindström, Miia. 2003. Diagnostics of Clostridium botulinum and Thermal Control of Nonproteolytic C. botulinum in Refrigerated Processed Foods. Helsinki: Yliopistopaino,
- 15 Lindquist, John. The Most Probable Number Method. Verkkoaineisto. University of Wisconsin – Madison, Department of Bacteriology. <<https://www.jlindquist.com/generalmicro/102dil3.html>>. Päivitetty 27.8.2012. Luettu 29.4.2019.
- 16 Oblinger J. L. & Koburger J. A. 1975. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. J. Milk Food Technol. Vol. 38, s. 540–545.

TPGY:n koostumus

50 g/l tryptonia (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)

5 g/l peptonia (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)

20 g/l hiivaa (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)

4 g/l glukoosia (VWR chemicals, Leuven, Belgia)

1 g /l natriumtioglykolaattia (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa)