

# STERİLİZASYON İNDİKATÖRÜ OLARAK Bacillus Stearothermophilus SPORLARI

Dr. Fatih YILDIZ

ODTÜ - Gıda Mühendisliği Programı  
Ankara

## GİRİŞ

Diğer gıda konserve yöntemleri yanında aseptik paketleme tekniği de giderek artan bir önem kazanmaktadır. Bu yöntemlerin besinlerin renk, koku, yapı ve besin öğelerine etkisi yanında; sterilizasyonu sağlama yönünden etkinlerinin saptanması da zorunludur. Genel olarak yüksek ısıda kısa sürede işleme (UHT) olarak tanımlanan aseptik paketleme tekniğinde; steril besin maddeleri steril paketlere aseptik koşullarda doldurularak konserve edilmektedir. Bu yöntemle işlenen gıda maddelerinde ısı iletimi genellikle çabuk ve etkin olduğundan, kalite açısından kayıp az, bozulmadan dayanma süresi ise daha uzun olmaktadır. Örneğin; pastörize süt buz dolabı koşullarında bir hafta dayanabildiği halde, UHT yöntemi ile işlenmiş steril süt oda sıcaklığında iki aydan daha fazla dayanabilmektedir.

Gıda endüstrisinde «ticari sterilize» ye ulaşılması amaçlanmaktadır ve bu da gıdaların tüketiciye ulaşmaya kadarki depolama ve taşıma sırasında bozulmasını önlemek için her türlü mikroorganizmanın öldürülmesi ya da inaktive edilmesi anlamına gelmektedir.

Gıda işlemede kullanılan çok sayıdaki fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı dayanıklı olan bakteriyel endosporlar, aşağıdaki nedenlerden dolayı büyük önem taşımaktadır.

- Biyolojik sistemler içinde ısıya en dayanıklı canlılar olarak bakteriyel endosporlar görünmektedir.
- Gıda muhafazasında, bozulma (kokma, ekşime, acıma, çürüme v.b) gibi istenmeyen değişikliklerin işleme ile önlenmesi gerekmektedir.
- Gıda işleme ile, besin maddelerinin dayan-

ma süresi maksimuma çıkarılırken, halk sağlığının güvence altına alınması ve her türlü gıda zehirlenmesi olasılığının önlenmesi (örneğin; *clostridium botulinum* gibi) zorunlu bulunmaktadır.

- Isı ile dayandırma ekonomik ve etkin bir sterilizasyon yöntemi olarak kullanılmaktadır ve kullanılmaya devam edeceği sanılmaktadır.

Gıda işlemede gerekli sterilizasyonu sağlamak amacı ile; besin maddesinin cinsine, içine konulduğu kabın cinsi, şekli ve büyüklüğüne ve kullanılan sterilizatöre göre optimum ısı derecesi ve ısıtma süresinin saptanması gerekmektedir. Sterilizasyon koşullarının saptanmasında ise genellikle ısıya dayanıklılığı bilinen bir test mikroorganizması kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan mikroorganizmalar arasında **Bacillus Stearothermophilus**, nemli ortamda ısıya en dayanıklı sporları oluşturduğundan dolayı büyük önem taşımaktadır. Bu mikroorganizmanın kurutma kağıdına emdirilmiş sporlarının ilaç, kozmetik ve medikal sanayinde sterilize indikatörü olarak kullanılması önerilmektedir (COOK ve BROWN, 1965).

**Bacillus Stearothermophilus** özellikle pH sı yüksek mısır, fasulye, nohut, havuç gibi gıdalarda bozulmaya neden olmaktadır. Bu bakterinin sporları, pH sı 6,95 olan fosfat tampon çözelti içinde 120°C de 35 dakikalık ısı işlemine dayanabilmektedir (HILL ve FIELUS, 1967).

Bilindiği gibi gerek sporların ve gerekse vejetatif bakteri hücrelerinin ısıya dayanıklılığı değişmez bir özellik değildir ve aşağıdaki etkenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir :

- Spor yapısındaki biyomoleküllerin kararlı

olması, metabolik mekanizma ve genetik özellikler gibi yapısal etkenler,

- b) Bakteri hücresinin büyüme, üreme ve spor oluşturmada sırasındaki çevre koşulları (termofil bakteri sporlarının ısıya dayanıklılığının mezofil bakterilerinkinden daha fazla olması gibi),
- c) Spor ve vejetatif hücrelerin ısıyla temas sırasındaki çevre koşulları (örneğin; asitli gıdalarda bakteri ve sporların öldürülmesinin daha kolay olması).

Doğada spor oluşturan bakteri türleri fazla yaygın değildir. Bacillaceae familyasının *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* cinsleri toplam 115 tür bakteri içermektedir (BUCHANAN, 1974). Oysa dış etkenlere dayanıklı olduklarından dolayı sporlar daha yaygın olarak bulunmaktadır. Hijyenik koşullarda elde edilmiş çiğ sütlerin ml. sinde toplam 15 adet spor bulunurken, kötü koşullarda elde edilen çiğ sütlerde ise ml. de 1000 adet spor bulunabilmektedir (WESTHOFF ve DOORES, 1976).

Öte yandan; sporların doğada ve laboratuvarında her zaman gözlemlenen bir olgu olmasına karşın, sterilizasyon koşullarının saptanması denemeler için gerekli olan ısıya dayanıklı çok sayıda sporun üretilmesi sorun olmaktadır. Spor üretimi halen katı besin yerinde ve Nutrient-Ager yöntemi ile yapılmaktadır. Bu teknikte spor üretimi 5-8 gün sürmekte ve elde edilen sporlar ise ısıya dayanıklılık bakımından homojen özellik göstermemektedir.

Bu çalışma ile; çok sayıda ısıya dayanıklı, homojen özellikte *Bacillus stearothermophilus* sporlarının üretilmesi için sıvı bir besi yeri ile optimum çevre koşullarının saptanması amaçlanmış bulunmaktadır.

## MATERYAL VE METOD

### 1. Vejetatif Hücre Sayısının Optimizasyonu, Test Kültürünün Elde Edilmesi ve Korunması

*B. Stearothermophilus* (1518 Smooth Variant) kültürü, ABD Ulusal Gıda Üreticileri Birliği (National Food Processors Association, Washington D.C.)'nden sağlanmış ve tryptica-

se-soy agar (BBL) yatık besi yerlerinde muhafaza edilmiştir. Bu besi yerlerinin 58°C de 24 saat inkübe edilmesi ile çoğaltılan sporlar, 4800 devir/dakikada (2600x9) 15 dakika santrifüj edilerek ayrılmıştır. Steril damıtık su ile dört kez aynı şekilde yıkama işlemi uygulanmış ve sporlar steril damıtık su içinde süspansiyon halinde 3.3°C de muhafaza edilmiştir.

En çok vejetatif hücre veren besi yerini saptamak amacı ile şu sıvı yerleri denenmiştir: a) Nutrient broth (Difco), b) Eugon broth (BBL), c) Trypticase soy broth, T-soy (BBL), d) Glucose tryptone broth (BBL) ve e) Sporulation broth (BBL).

T-soy besi yeri eklenen minarel maddelerle daha da geliştirilmiştir. Bu amaçla filtrasyonla sterilize edilmiş olan  $\text{CaCl}_2$  (25 ppm),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (31 ppm),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (30ppm) ve  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (11 ppm), T-soy besi yerine katılmıştır.

**B. Stearothermophilus'un üreme eğrisi,** 600 nm de spektrofotometrik turbidite (bulanıklık) ölçümü ile (Bausch ve Lomb-Spektronik 20) izlenmiştir. Vejetatif hücre, spor taşıyan hücre (sporangia) ve spor sayımı; mikroskopte (Leitz-Optometric) 430 magnifikasyonda yapılmıştır. Optimal inakülasyon tipini saptamak amacı ile de; a) ısı ile şok edilmiş spor inakülasyonu (80°C de 5 dakika tutulmuş logaritmik büyüme safhasında hücre), b) ısı ile şok edilmiş ve 58°C de 7 saat inkübe edilmiş spor inakülasyonu (duraklama safhasındaki vejetatif bakteri inakülasyonu), c) % 1 spor inakülasyonu ve d) % 0,1 spor inakülasyonu denenmiş bulunmaktadır.

### 2. Sporulasyonun Optimizasyonu İçin Çevre Koşullarının Saptanması

Bu amaçla; a) pH, b) Havalandırma, c) ısı ve d) Su aktivitesi (Aw) gibi çevre koşulları için optimum değerler araştırılmıştır.

### 3. Üretilen Sporların Isıya Dayanıklılığının Saptanması

Değişik sayıdaki spor süspansiyonları üç farklı ortam ve yağ banyosu içinde (Haake) ısıtılarak ölüm kinetikleri saptanmıştır. Spor süspansiyonları; damıtık su ( $5.0 \times 10^6$  spor/ml), steril süt ( $1.1 \times 10^6$  spor/ml) olmak üzere değişik 3 tiptir.

Bu amaçla spor süspansiyonları 2 ml'lik cam ampuller içinde yağ banyosunda 121.1°C de ısıtılarak canlı kalanlar eğrisi çizilmiştir. Boş cam ampullerden birisi içine mikrotermokupül konularak da, ampullerin istenilen ısı derecesine erişmesi için geçen zaman saptanmış ve hesaba katılmıştır.

Steril süt süspansiyonundaki sporların; 115.6°C, 121.1°C ve 127.6°C olmak üzere üç farklı ısı derecesindeki ölüm eğrileri çizilmiştir. Bu eğrilerin linear regresyon analizi ile D değerleri hesaplanmıştır. D değerlerinin logaritması ve ısı değerlerine karşı çizilen grafikten ısısal ölüm eğrisi elde edilmiş ve bu eğrinin eğiminden de Z değeri hesaplanmıştır. F değeri ise;

$F = D_{121.1} (\log A - \log B)$   
eşitliğinden bulunmuştur. Bu eşitlikteki A ba-

Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup> ve Fe<sup>++</sup> mineral tuzları ile zenginleştirilmiş ve % 0,1 duraklama safhasındaki hücrelerle aşılacaktır. Isı 58°C ye, pH 7,1 e, havalandırma 18.000 ml/dak. ya ve karıştırma da 500 devir/dak. ya ayarlanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan sporlar ayrılarak alınmıştır.

## ARAŞTIRMA BULGULARI

### 1. Üreme Dönemelerine İlişkin Bulgular

Daha önce değinildiği gibi, bu amaçta 5 farklı sıvı besi yeri denenmiştir. Bunlar arasında trypticase soy sıvı besi yeri, toplam hücre sayısının en çok ve spor üretmesinin en fazla olduğu besi yeri olarak bilinmiş ve bu nedenle daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. B. Steorthermophi us'un Değişik Besi Yerlerinde 48 Saat Inkübasyonu ile Elde Edilen Sonuçlar

Sıvı Besi Yeri	Spor Sayısı adet/ml	Toplam Bakteri adet/ml	Sporulasyon %	pH Değişimi	
				Başta	Sonda
Nutrient broth	2.3x10 <sup>6</sup>	9.0x10 <sup>7</sup>	3.2	7.15	7.00
Glucose Tryptonbroth	2.3x10 <sup>6</sup>	6.0x10 <sup>7</sup>	2.8	6.90	6.60
Eugon broth	2.3x10 <sup>6</sup>	8.0x10 <sup>7</sup>	4.6	6.70	6.67
Trypticase-Soy broth	1.5x10 <sup>7</sup>	4.8x10 <sup>8</sup>	3.1	7.10	7.27
Sporulation broth	3.6x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	9.0	7.00	7.12

langıçtaki spor sayısını, B ise ısı işleminden sonraki spor sayısını göstermektedir.

### 4. Çok Sayıda Spor Üretimi

Bu amaçla 9.0 litre trypticase soy sıvı besi yeri fermentöre konulmuş, 121°C de 85 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Daha sonra, filtrasyonla steril duruma getirilmiş olan

Trypticase-soy sıvı besin yerine ayrıca bazı mineral tuzlar eklenmesi ile spor ve bakteri üreme sayısı izlenmiş ve bu besi yerine 25 ppm CaCl<sub>2</sub>, 31 ppm FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 30 ppm MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ve 11 ppm MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O eklendiğinde gerek spor ve gerek toplam bakteri sayısının en yüksek düzeye ulaştığı görülmüştür (Tablo 2).

Tablo 2. B. Steatorthermaphilus'un T-Soy Sıvı Besi Yerine İki Farklı Konsantrasyonda Tuz Eklendikten Sonra 24 Saat Inkübasyonu ile Elde Edilen Sonuçlar.

Besi Yeri	Spor Sayısı adet/ml	Toplam Bakteri adet/ml	Sporulasyon %	pH Değişimi	
				Başta	Sonda
Trypticase-Soy-A	5.0x10 <sup>8</sup>	6.6x10 <sup>8</sup>	75.6	7.10	7.65
Trypticase-Soy-B	2.3x10 <sup>6</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	4.6	7.10	6.70

T-Soy A : 25 ppm Ca<sup>++</sup>, 30 ppm Mn<sup>++</sup>, 31 ppm Fe<sup>++</sup>, 11 ppm Mg<sup>++</sup>

T-Soy B : 125 ppm Ca<sup>++</sup>, 100 ppm Mn<sup>++</sup>, 150 ppm Fe<sup>++</sup>, 116 ppm Mg<sup>++</sup>

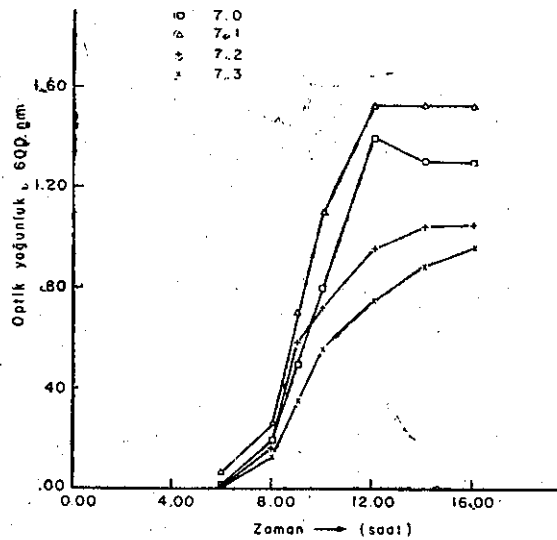
Değişik inakülasyon tipleri arasında spor ve toplam bakteri sayısı açısından büyük farklar bulunmamakla birlikte, % 0,1 duraklama safhasındaki hücre inakülasyonunun daha iyi sonuçlar verdiği ortaya çıkmaktadır (Tablo 3).

Besi yerinin su aktivitesi, 58°C de ölçülen oransal nem miktarından (% 98,5) hesaplanarak 0,985 olarak bulunmuştur.

Tablo 3. Değişik İnakülasyonların *B. Stearothermophilus*'un T-Soy Besi Yerinde 15 Saat İnkübasyonu İle Elde Edilen Sonuçlar

İnakülasyon Tipi ve Miktarı	Spor Sayısı adet/ml	Toplam Bakteri adet/ml	Sporu- lasyon %	pH Değişimi	
				Başta	Sonda
Isı ile şok edilmiş spor (%.1)	5.7x10 <sup>6</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>	2.2	7.36	5.82
Spor (0.1)	3.6x10 <sup>6</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	2.9	7.36	5.49
Logaritmik fazdaki hücreler	7.2x10 <sup>6</sup>	3.5x10 <sup>8</sup>	2.0	7.36	5.77
Duraklama fazındaki hücreler (0.1)	1.1x10 <sup>6</sup>	4.8x10 <sup>8</sup>	2.3	7.36	5.60
Duraklama fazındaki hücreler (0.1)	9.1x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>8</sup>	2.3	7.36	5.70

Optimum çevre koşullarını saptamak amacıyla yapılan denemeler ise, en uygun pH değerinin 7,1 en uygun sıcaklığın 58°C ve en iyi havalandırmanın 3000 ml/dak. olduğunu göstermiş bulunmaktadır (Şekil 1, 2, 3).



Şekil 1. Farklı pH değerlerinin *B. Stearothermophilus*'un üremesine etkisi (T-soy broth ve 58°C)

## 2. Isıya Dayanıklılık Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar

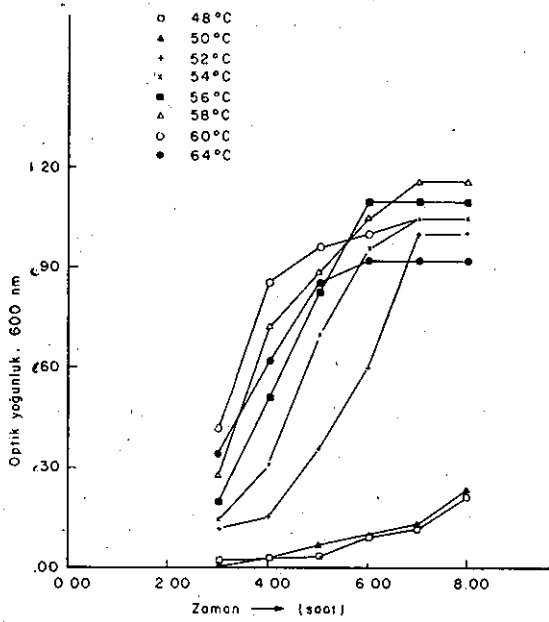
*B. Stearothermophilus* sporlarının üç değişik süspansiyondaki  $D_{121,1}$  Değerleri Tablo 4'de görülmektedir. Steril süt süspansiyonundaki sporların 115,6°C, 121,1°C ve 127,6° deki canlı kalanlar eğrileri ise şekil 4 te verilmiş bulunmaktadır.

Bu eğrilerden hesaplanan D değerleri ise sırası ile 22,4, 3,5 ve 0,37 dakikadır. D değerlerinin logaritmasının sıcaklık derecesine karşılık olmak üzere çizilen grafikten (Şekil 5) Z değeri, 6,11°C olarak hesaplanmıştır.

F değeri formül yöntemi ile hesaplanmış ve 22 dakika olarak bulunmuştur.

Tablo 4. *B. Stearothermophilus* Sporalrının Üç Ayrı Süspansiyondaki  $D_{121,1}$  Değerleri

Ortam	Hücre Sayısı	
	Başlangıç adet/ml	$D_{121,1}$ Değeri Dakika
Damıtık Su	5.0 x 10 <sup>6</sup>	2.9
Steril Süt	1.5 x 10 <sup>6</sup>	3.5
1.0 M NaCl	1.1 x 10 <sup>6</sup>	7.8



Sekil 2. Farklı ısı derecelerinin *B. Stearothermophilus*'un üremesine etkisi.

## TARTIŞMA

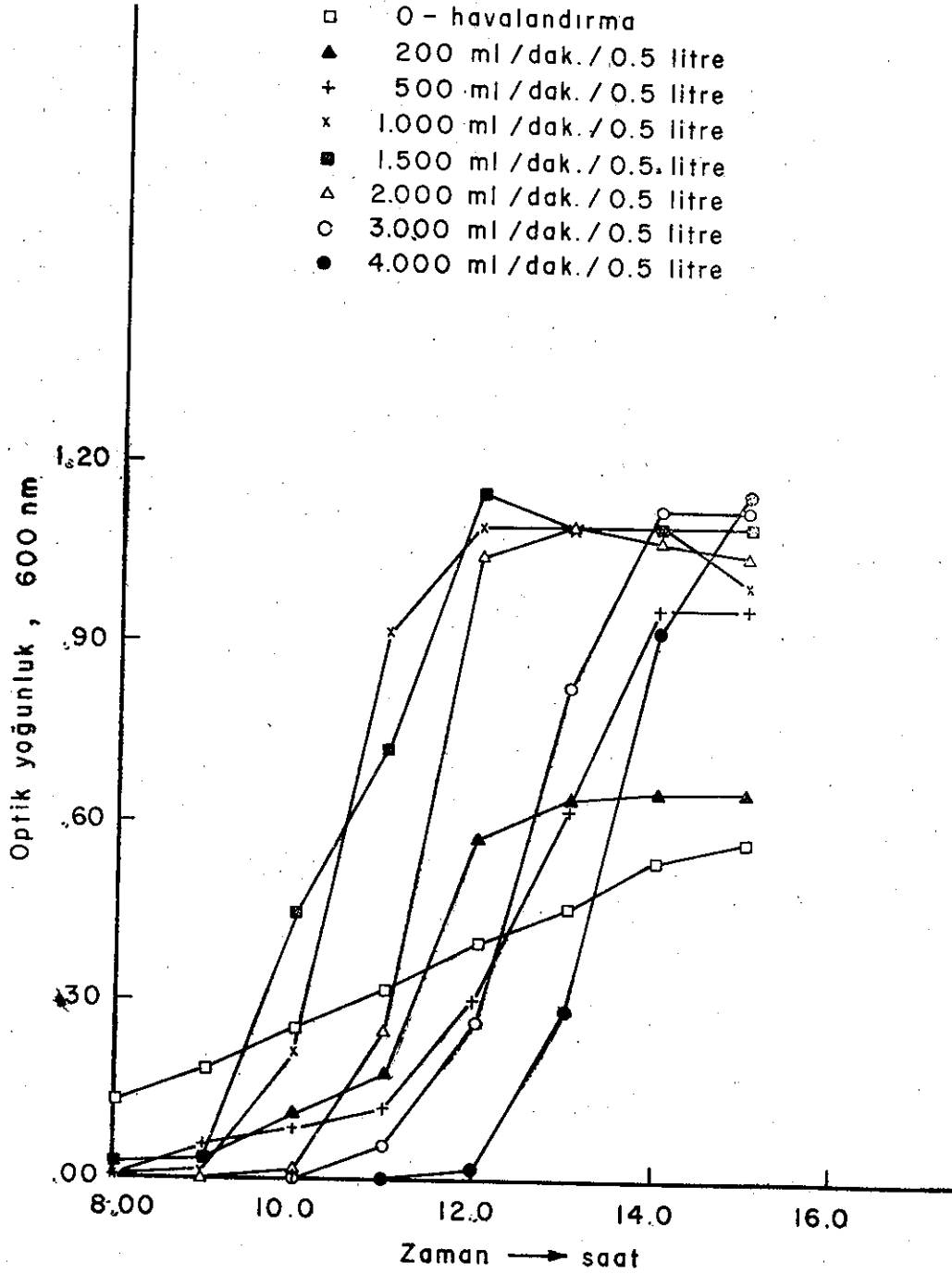
Trypticase-soy sıvı besi yeri, *B. Stearothermophilus* hücrelerinin üremesi ve spor oluşturmaları için gerekli olan amino asit, peptid, karbonhidrat ve vitaminleri içermektedir. Mineral besin maddeleri bakımından ise yetersizdir. Spor oluşturma sırasında ihtiyaç duyulduğu bilinen mikroelementlerden  $Ca^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$  nin (ORDAL, 1957), belirtilen oranlarda bu besi yerine eklenmesi, spor üretimi açısından olumlu sonuç vermiştir (Tablo 1 ve 2). Optimum koşullarda % 75 sporulasyon ile toplam  $5.0 \times 10^8$  adet/ml spor elde edilmiştir (Tablo 2). İnakülasyon tipi, sporulasyon açısından inakülasyon miktarından daha önemli görünmektedir. Duraklama safhasındaki bakteri inakülasyonunun optimum sonuç vermiş olması, senkronize kromozom replikasyonunun spor oluşumundan önemli olduğu hipotezine (MANDELSTAM, 1976) bir kanıt olması bakımından anlamlıdır (Tablo 3). Havalandırma, her oranda vejetatif büyümeyi ve sporulasyonu artırmıştır (Şekil 3). Fakat, çok yüksek havalandırma düzeylerinde (4000 ml/dak./litre ve daha yüksek) uzayan bir gecikme safhası gözlenmiştir. Bu durumun, oksijenin yüksek konsantrasyonlarda radikal oluşturarak hücre zarını zedelemesinden ileri gelmesi olasıdır. Ayrıca,

oksijenin yüksek konsantrasyonlarda amino asitlerin hücre içine taşınmasını durdurduğu da belirtilmektedir (PIRT, 1975).

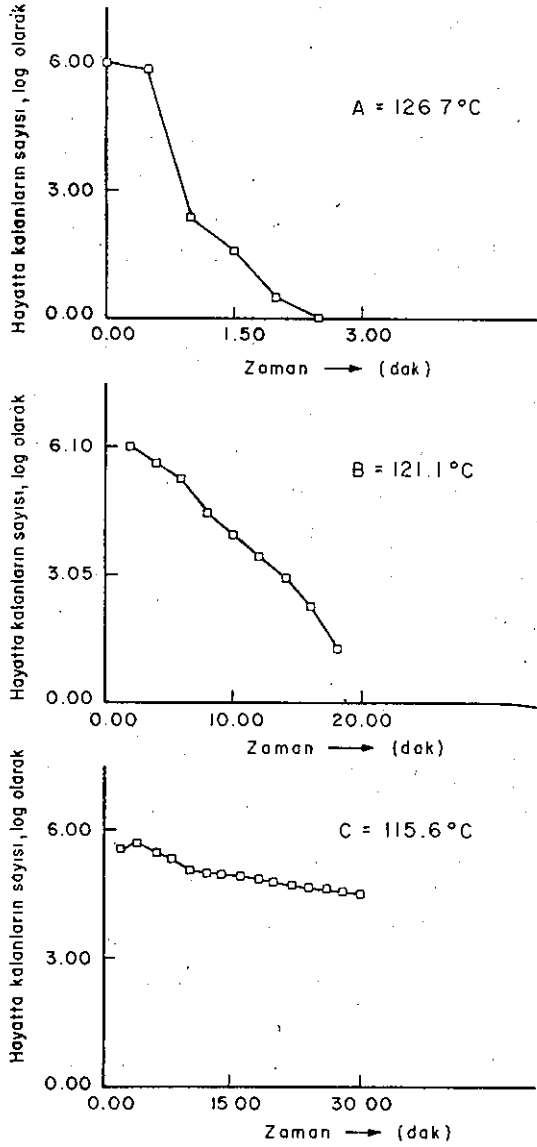
*Bacillus Stearothermophilus*'un enzim sistemi pH = 7.1 de en aktif olduğu için, bu pH da hücrelerin üremesi ve sporlaşması maksimum düzeyde olmuştur (Şekil 1). Burada ölçülen ortamın pH sıdır. Oysa hücre zarının  $[H^+]$  ve  $[OH^-]$  iyonları için tam geçirgen (permeabil) olmadığı bilinmektedir (MITCHELL, 1961). Sporulasyonda ortam yerine hücre içi pH'nın ölçülebilmesi daha önemli olabilir.

Isı 45°C nin altına düştüğünde *B. Stearothermophilus*'un çoğalması mümkün olmamıştır. Ayrıca 68°C nin üzerinde, belki de bazı kritik enzimlerin inaktivasyonu nedeniyle herhangi bir çoğalma görülmemiştir (Şekil 3). Vejetatif büyüme için 60°C optimum olmakla birlikte, sporulasyon için daha uygun olması nedeni ile 58°C kullanılmıştır. Su aktivitesi (AW) ve pH için hücre içi ile dış ortamın dengeleşmesi söz konusu olduğu halde, ısı için böyle bir durum söz konusu değildir. Yani hücre içi ile çevre aynı ısı derecesinde olacaklardır. Katılan mikroelementlerin, 58°C gibi yüksek ısı derecesinde bile besi yeri içeriğindeki diğer maddeler ve su ile birleşerek su aktivitesinin azalmasına yol açmadığı, su aktivitesinin AW=0,985 olmasından anlaşılmaktadır.

Sporların ısıya dayanıklılığını kimyasal ozmotik hipotezi ile açıklayan GOULD ve DRING (1975) e göre, ortamın ozmotik basıncı ısıya dayanıklılığı etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Bu nedendir ki, ozmotik basınç açısından belirgin farklılık gösteren destile su, steril süt ve 1.0 M NaCl gibi üç ayrı ortamda gerleri sırasıyla 2.9, 3.5 ve 7.8 dakika olarak *B. Stearothermophilus* sporları için  $D_{121.1}$  değerleri sırasıyla 2.9, 3.5 ve 7.8 dakika olarak saptanmıştır (Tablo 4). Bu bulgular, ortamın ozmotik basıncının ısıya dayanıklılıkta önemli olduğunu kanıtlamaktadır. Steril süt içinde ve üç farklı ısı derecesinde (115.6°C, 121.1°C ve 126.6°C) ise D değerleri, sırası ile 22.4, 3.5 ve 0.37 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4). Fantom ısıl ölüm eğrisinden  $Z = 6.1^\circ C$  ve formül yöntemi ile de  $F_{121.1} = 22$  dakika olarak hesaplanmıştır.

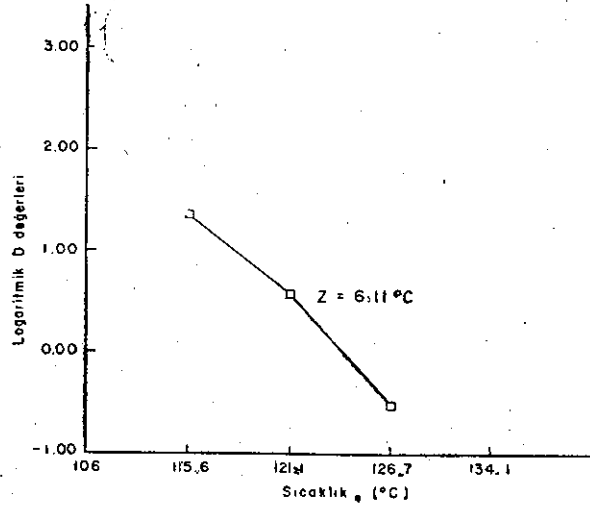


Sekil 3. B. Stearothermophilus'un Trypticase soy sıvı besiyerinde 58°C.de sekiz farklı havalandırma hızında üreme eğrileri.



Şekil 4. Steril süt süspansiyonundaki *B. Stearothermophilus* sporlarının hayatta kalanlar eğrileri

Yukarıda verilen bilgiler, *B. Stearothermophilus* sporlarının gıda endüstrisinde «biyolojik sterilite indikatörü» ve optimum sterilizasyon koşullarının saptanmasında «test organizması» olarak kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 5. Steril süt süspansiyonundaki *B. Stearothermophilus* sporlarına ait fantom ısı ölüm eğrisi

Elde edilen sporlar aseptik paketlenme (dolun) sistemlerinde «spozit etkinlik» denemelerinde de kullanılabilir. Bu sistemlerde spozit etkinlik; D, Z ve F parametrelerine oranla daha pratik sonuçlar verebilir. Bu amaçla, bilinen sayıda *B. Stearothermophilus* sporları işlemeden önce süte aşılınmakta, süt UHT sisteminden geçtikten sonra spor sayımı yapılmaktadır. Elde edilen sayım sonuçlarından herhangi bir sterilizatörün «spozit etkinliği» veya ısıya dayanıklı sporları öldürebilme kapasitesi aşağıdaki eşitlikten bulunabilmektedir :

$$\text{Sporozit etkinlik} = \log \frac{A}{B}$$

Bu eşitlikte A inaküle edilen spor sayısını, B ise sterilizasyondan sonraki spor sayısını adet/ml olarak göstermektedir.

Sterilizasyondan sonraki spor sayımı, aseptik koşullarda alınmış 10.0 ml lik küçük ve 5.0 litrelik büyük örneklerde yapılmaktadır. Örneğin; başlangıçtaki spor sayısı 1000 adet/ml olan bir süt, işleme sonunda 1 adet/5.0 litre spor içeriyorsa, takribi spor sayısında 7 logaritmik devre azalma olmuştur, yani spozit etkinlik 7 dir.

#### L İ T E R A T Ü R

1. Buchanan, R. E., and N. E. Gibbons 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. pp. 529-579. The William and Wilkins G., Baltimore.
2. Cook, A. M., and Brown, M. R. W. 1965. Relationship between Heat Activation and Percentage Colony Formation for *Bacillus Stearothermophilus* spores: Effects of Storage

- anr pH of the Recovery Medium.
3. Gould, G. W., and G. J. Dring 1975. Role of expanded Cortex in resistance of bacterial endospores. pp 541-546.
  4. Hill, W. M., and M. L. Fields 1967 Factors affecting growth and Interaction of rough and smooth variants of *Bacillus Stearothermophilus*.
  5. Mandelstam, J. 1976. Bacterial Sporulation: A problem in the biochemistry and genetics of a primitive development system. Proceedings of the Royal society of London E, 193 : 89-106.
  6. Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191 : 144-148.
  7. Ordal, J. Z. 1957. The Effect of nutritional and environmental condition of sporulation, p. 18 in spores, H. O. Halvorson (ed). American Institute of Biological Sciences, Washington D. C. publication No. 5.
  8. Pirt, J. S. 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. John Wiley and Sons, Inc., New York.
  9. Westhoff D. C., and Doores S. 1976. Milk Processed by a faaling-film pasteurized-Sterilizer. I. Microbial stability at various processing temperatures. J. of Dairy Science Vol. 59, 1003-1009.



ATATÜRK ORMAN ÇİFTLİĞİ  
SÜT VE MAMULLERİNİ  
DENEDİNİZ Mİ ?