

ÇEŞİTLİ BESİYERLERİNİN *BACILLUS CEREUS* SPORLANMASINDAKİ ETKİSİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA*

Gizem Özlük Çilak¹, A. Kadir Halkman²

¹Hitit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Merkez, Çorum, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gölbaşı, Ankara, Türkiye

Geliş / Received: 12.01.2018; Kabul / Accepted: 26.02.2018; Online baskı / Published online: 08.03.2018

Özlük Çilak, G. Halkman A.K. (2018). Çeşitli besiyerlerinin *Bacillus cereus* sporlanmasındaki etkisi üzerine bir araştırma. *GIDA* (2018) 42 (2): 347-355 doi: 10.15237/gida.GD18016

Özlük Çilak, G. Halkman A.K. (2018). A research on the effect of various culture media for sporulation strenght of *Bacillus cereus*. *GIDA* (2018) 42 (2): 347-355 doi: 10.15237/gida.GD18016

ÖZ

Gıdalarda *Bacillus cereus* kaynaklı hastalıklarda bakterinin sporlanması ve germinasyonu önemlidir. Bakteriler, yaşamsal bir tehdit altında olduklarında spor oluştururlar ve koşullar normale döndüğünde çimlenerek yaşamlarına devam ederler. Gıdanın bileşimi de sporlanma üzerinde etkilidir. Bu çalışmada, literatürde rastlanan 8 farklı besiyeri kullanılmak suretiyle, *B. cereus*'un sporlanması için en uygun besiyerinin seçilmesi amaçlanmıştır. Seçilen besiyerlerine önceden aktifleştirilmiş *B. cereus* ATCC 11778 suşu inoküle edilmiş, inkübasyona bırakılan besiyerlerinden 5., 12. ve 18. günlerde sonuç alınmıştır. Bakterilerin ne kadarının spor oluşturduğu, % TSAMB/TAMB oranı ile belirlenmiş ve sporlanma verimi en yüksek besiyeri belirlenmiştir. En hızlı sporlanma 5 gün sonunda %58 oranla m-TGEA'da gerçekleşirken 18 gün inkübasyon sonucunda en yüksek spor oranı %92 ile m-DTSB besiyeri en verimli besiyeri olarak seçilmiştir. Besiyeri içeriklerinin sporlanma hızını ve oranını etkilediğinin gözlemlendiği çalışmada su aktivitesinin düşüklüğü, mangan bileşiklerinin varlığı ve karbon kaynağının düşüklüğünün sporlanmayı desteklediği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Bacillus cereus*, sporlanma, besiyeri

A RESEARCH ON THE EFFECT OF VARIOUS CULTURE MEDIA FOR SPORULATION STRENGTH OF *BACILLUS CEREUS*

ABSTRACT

Sporulation and germination of *Bacillus cereus* are important about foodborne illnesses. Bacteria form spores when there's any life threat and germinate when the conditions are back to normal. Composition of the food also affects sporulation. In this study, 8 different kinds of media found in literature were studied and selecting optimal medium for *B. cereus* sporulation was aimed. *B. cereus* ATCC 11778 was inoculated to the media and results were obtained on 5th, 12th and 18th days. Sporulation efficiency was indicated by percentage of TSAMB to TAMB. The fastest sporulation was occurred in m-TGEA medium in 5 days with 52 % efficiency rate, whereas m-DTSB was selected as the most effective medium with 92 % efficiency rate. In this study, it was observed that, content of media highly affects sporulation velocity and rate. Low water activity, occurrence of manganese compounds and low carbon sources supports formation of spores.

Keywords: *Bacillus cereus*, sporulation, medium

* Bu çalışma, Gizem Özlük Çilak'ın doktora çalışmasının bir bölümüdür / This paper is a part of PhD study of Gizem Özlük Çilak

¹ Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉ gizem.ozluk@gmail.com

☎ (+90) 532 740 8607

☎ (+90) 364 227 4535

GİRİŞ

Bacillus cereus, Gram pozitif, çubuk şekilli, fakültatif anaerop, endospor oluşturma yeteneğinde bir bakteridir (de Vries vd., 2004; Hussain ve Oh, 2018). Toprak kaynaklı bir bakteri olan *B. cereus*, pirinç, et, sebze, çiğ süt, süt ürünleri, baharat gibi çok çeşitli gıdalarda yaygın olarak bulunmakta ve gıda kaynaklı hastalıklara yol açmaktadır. *B. cereus*, çiğ gıdalarda bulunabildiği gibi işlenmiş ve pişmiş gıdalarda da bulunabilmektedir (Organji vd., 2015). Donmuş ve pastörize ürünlerde de canlı sporların bulunması ve depolama sırasında düşük sıcaklıklarda bile germine olabilmeleri son zamanlarda *B. cereus* hakkındaki endişeleri artırmıştır (de Vries vd., 2004, van Melis vd., 2014). *B. cereus* aynı zamanda biyofilmlerde de spor oluşturma yeteneğindedir (Hayrapetyan vd., 2015).

Birçok *B. cereus* suşu toksin üretme yeteneğindedir ve hem enfeksiyon hem de intoksikasyon tip gıda kaynaklı hastalıklara yol açabilmektedir (de Vries vd., 2004; Organji vd., 2015). Bakteri, 40 kDa ağırlığında, sıcaklığa dayanıklı (Stabil Toxin; ST) ve 5-7 kDa ağırlıkta, sıcaklığa dayanıksız (Labil Toxin; LT) olmak üzere, iki farklı toksin oluşturur. Protein yapısındaki ST, 126 °C'ta 90 dakikada inaktif hale gelirken LT 60 °C'ta birkaç dakikada inaktive olabilen bir peptittir (Tunail, 2000, Halkman, 2013, Lakha vd. 2017). Gıdalarda *B. cereus* kaynaklı hastalıklar genellikle; kontamine gıdaların pişirildikten sonra hızlı soğutulmadıklarında canlı ve ısıya dirençli sporların germinasyonu ve çoğalması ile ortaya çıkmaktadır (Kalkan, 2006, Lakha vd. 2017). Bu durumun önüne geçmek için yapılan çalışmalar bakterinin sporlanması ve germinasyonu üzerine odaklanmıştır (de Vries vd., 2004, Hayrapetyan vd. 2016).

Bakteriyel endospor oluşumu, çevresel olumsuzluklara karşı bakterinin adapte olarak cevap vermesi olayıdır (Abe vd., 2017). Endospor oluşumu (sporulasyon), bakterinin sitoplazma yüzeyini azaltarak metabolizma hızını düşürmesiyle gerçekleşir. Sporların geçirgenlikleri fazla, fiziksel ve kimyasal faktörlere dirençleri yüksek ve ağırlıkları düşüktür (Arda, 2000). Spor

oluşum süresi bakterinin türü, ortam sıcaklığı ve özellikle karbon ve azot kaynaklarındaki azalmaya bağlı olarak değişmektedir (Pommerville ve Jeffrey, 2014). Sporulasyon, karbon ve enerji isteyen bir olaydır. Azotlu bileşikler (bazı aminoasitler) ve bazı türler için de metalik iyonlar (Mn^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Mo^{++} , vs.) sporulasyonu uyarırlar (Vasantha ve Freese, 1979; Arda, 2000, Mhatre vd.; 2016). Vejetatif hücrelere göre, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, kimyasallar, ışınlama vb. olumsuz çevre koşullarına daha dirençli olan sporlar, hiçbir metabolik etkinlik göstermedikleri için besin maddelerine gereksinim duymadan canlılıklarını sürdürebilirler (Anonymous, 2016).

Laboratuvar koşullarında kullanılan sporulasyon besiyerleri genellikle kompleks yapıda ve yaklaşık olarak ortak besin maddelerini içerir özelliktedirler. Bu besiyerleri genellikle pepton, maya ekstraktı, aminoasitler, demir, magnezyum, kalsiyum, bakır, mangan ve çinko gibi mineralleri içerir ve pH 7'ye yakın olarak ayarlanmaktadır. Bu besiyerlerinin formülasyonundaki temel prensip, besiyerinin içerikçe fakirleşmesine kadar bakterinin gelişmesi, daha sonra spontan olarak sporlanmasına dayanmaktadır. Bu yüzden inkübasyon süresi uzundur (Abbas vd., 2014).

Oluşan sporların özellikleri besiyeri içeriğine göre değişiklik göstermektedir. Besiyerinin sıvı veya katı oluşu oksijenin besiyerindeki dağılımını etkiler. Besiyerindeki mineral çeşitliliği, su aktivitesi, oksijen varlığı ve oksijenin besiyerindeki dağılımı, sporulasyonu ve spor özelliklerini etkilemektedir. (Hayrapetyan vd., 2016). Örneğin, *B. cereus*'un polistren mikrotiter plaklarında emetik toksin üreten suş sporlarının ısı direncinin, sıvı kültürden elde edilen sporlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (van der Voort ve Abee, 2013).

Literatürde *B. cereus* sporlanması ve germinasyonu ile ilgili birçok çalışma bulunmakta olup her birinde farklı besiyerlerinin kullanıldığı dikkat çekmiştir. Bu çalışmada, *B. cereus* sporlandırma için en uygun besiyerinin seçimi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM**Materyal**

Spor formunda bakteri eldesi için referans suş olarak Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *B. cereus* ATCC 11778 kullanılmıştır. Bakteri, sporlandırma besiyerine inoküle edilmeden önce Tryptic Soy (CASO) Broth (TSB/ CASO Broth, 1.05459, Merck) besiyerinde 28-30 °C'ta bir gece inkübasyon ile aktifleştirilmiştir.

Sporlandırma için Sporulation Medium Broth (SPMB) (Collado vd., 2005), Modifiye Nutrient Agar (m-NA) (Islam vd., 2006), Modifiye G Medium (m-GM) (Hornstra vd., 2007), Modifiye Tryptone Glucose Extract Agar (m-TGEA) (Peng, vd., 2001), Modifiye DTSB Agar (m-DTSB) (Peng, vd., 2001), Modifiye DTSB Agar + Sakkaroz (m-DTSB+S) (Peng, vd., 2001), Modifiye DTSB Agar + Laktoz (m-DTSB+L) (Peng, vd., 2001) ve Beef Extract Agar (BEA) kullanılmıştır. Kullanılan 8 çeşit besiyeri içerikleri aşağıda verilmiştir.

Sporulation medium broth (SPMB): Nutrient broth:13 g/L; NaCl: 3 g/L; MnSO₄.H₂O: 0.05 g/L; CaCl₂:0.06 g/L; glikoz: 0.1 g/L; (NH₄)₂SO₄:0.08 g/L; MnCl₂.4H₂O:0.008 g/L; 0.005 g/L; ZnSO₄.7H₂O:0.005 g/L.

Modifiye Nutrient Agar (m-NA): Nutrient Broth 20 g/L; MnSO₄.H₂O: 0.1 mM; Agar: 15 g/L.

Modifiye G-Medium (m-GM): maya ekstraktı: %0.2, KH₂PO₄: 2.87 mM, MgSO₄: 0.81 mM; ZnCl₂: 0,017 mM; FeCl₃: 0,0018 mM; CaCl₂: 0,17 mM; (NH₄)₂SO₄: 15,5 mM, CuSO₄.5H₂O: 0,02 mM; Agar: 15 g/L.

Tryptone Glucose Extract Agar (m-TGEA): Et ekstraktı: 3 g/L; Kazein: 5 g/L; Dekstroz: 1 g/L; MnSO₄.H₂O: 10 ppm; Agar: 15 g/L.

Modifiye Diluted Tryptic Soy Broth Agar (m-DTSB): KHPO₄: 1.0 g/L; Na₂HPO₄: 2.0 g/L; (NH₄)₂SO₄: 1.0 g/L; tryptic soy broth: 4.0 g/L; yeast extract: 0.1 g/L; Agar: 15 g/L; tuz çözeltisi: 0,6 mL/100 mL [Tuz çözeltisi: MgSO₄: 1 g/L; FeSO₄: 0.1 g/L; CaCl₂: 10 g/L; MnCl₂.4H₂O: 0.1 g/L].

Modifiye Diluted Tryptic Soy Broth Agar+ Sakkaroz (m-DTSB+S): m-DTSB+ sakkaroz: 10 g/L.

Modifiye Diluted Tryptic Soy Broth Agar+ Laktoz (m-DTSB+L): m-DTSB+ laktoz: 10 g/L.

Beef Extract Agar (BEA): Et ekstraktı: 3 g/L; pepton: 10 g/L; NaCl: 5 g/L; Agar: 15 g/L.

Besiyerlerinin son pH'sı 7±0.2 olacak şekilde 1 N HCl ve 1 N NaOH ile ayarlanmıştır.

Yöntem

Besiyerlerine aktif, vejetatif *B. cereus* ATCC 11778 suşu inoküle edilmiş, ekim yapılan besiyerleri 28 °C'ta 18 gün inkübasyona bırakılmış, 5., 12. ve 18. günlerde sonuç alınmıştır.

Aktif *B. cereus* ATCC 11778 suşu yaklaşık 5x10⁶ KOB/mL düzeyinde sıvı besiyerine (Sporulation Medium Broth) 1 mL/500 mL besiyeri oranında ilave edilirken, 7 çeşit katı besiyerine ise 0,1 mL yayma plak yöntemi kullanılarak inoküle edilmiştir. Sporlanma kontrolü için oluşan koloniler katı besiyerlerinden yıkama yapılarak hasat edilmiştir. Yıkama yapılan bu homojenizatın 10⁻¹. dilüsyon olduğu varsayılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Gerekli dilüsyonlardan toplam aerobik mezofil bakteri (TAMB) ve toplam sporlu aerobik mezofil bakteri (TSAMB) sayımı için ekimler gerçekleştirilmiştir. TSAMB sayımında, her besiyerinden alınan 10² ar mL numune 80 °C'ta 5 dak bekletilerek vejetatif bakterilerin imhası sağlandıktan sonra standart yöntemle sayım yapılmıştır. Besiyeri sporlanma veriminin belirlenmesi, bakterilerin ne kadarının spor oluşturduğu, TSAMB sayısının TAMB sayısına oranının yüzdesi ile belirlenmiş ve sporlanma verimi en yüksek besiyeri seçilmiştir.

Sporlanma açısından en verimli besiyerlerinden elde edilen sporlar muhafaza edilmiştir. Sporlanma besiyerinde sporlanmış olan bakterilerin, vejetatif formlardan ayrılması için hasat edilen sporlar 10 mL steril saf su içine alınmış ve 80 °C'ta 5 dak tutulmuştur. Sporların muhafazası Hornstra vd., 2007'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Bu amaçla, saf su içindeki sporlu bakteri kültürü santrifüj tüplerine

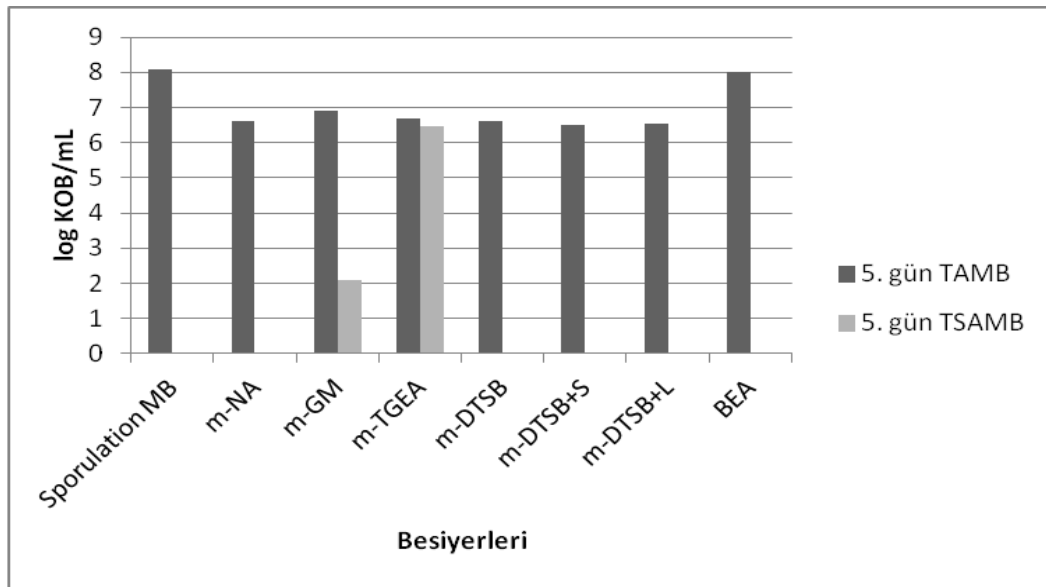
aktarılmış, 2500 g'de santrifüjlenmiş, süpernatant atıldıktan sonra pelet üzerine steril saf su eklenmiş, tüpler karıştırıldıktan sonra aynı koşullarda yeniden santrifüjlenmiştir. Yıkama işlemi 4 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüjleme sonrasında peletler %0.01 Tween 20 içeren 5'er mL 1mM fosfat tampon (pH 7.4) içinde daha sonraki kullanımlar için 4 °C'ta muhafaza edilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Sekiz çeşit sporlandırma besiyerinden elde edilen TAMB ve TSAMB sayıları Şekil 1, 2, 3 ve Çizelge 1'de görülmektedir.

TAMB sayısı besiyeri çeşidine göre değişiklik göstermiştir. m-DTSB+L besiyerinde hiçbir

gelişim olmazken diğer tüm besiyerlerinde zamanla artış gözlenmiştir. TSAMB oluşumu ise m-NA, m-DTSB+L ve BEA besiyerlerinde gözlenmemiş, 80 °C'ta ısı işlemi sonucunda yapılan ekimlerde bu besiyerlerinde 18. gün sonunda gelişim olmadığı gözlenmiştir. TAMB ve TSAMB sonuçlarının her ikisinde de 12-18 gün aralığında önemli bir değişim olmamıştır. Sporlanma 5. günde yalnızca m-TGEA ve m-GM'de gerçekleşirken 12. günde SPMB, m-DTSB ve m-DTSB+S besiyerlerinde de spor oluşmuştur. Sporlanma en hızlı m-TGEA'da gerçekleşmesine rağmen en iyi sporlandırma besiyerinin bu olduğu söylenemez. Sporlandırmanın verimliliği için TSAMB/TAMB oranlarına bakılmıştır.

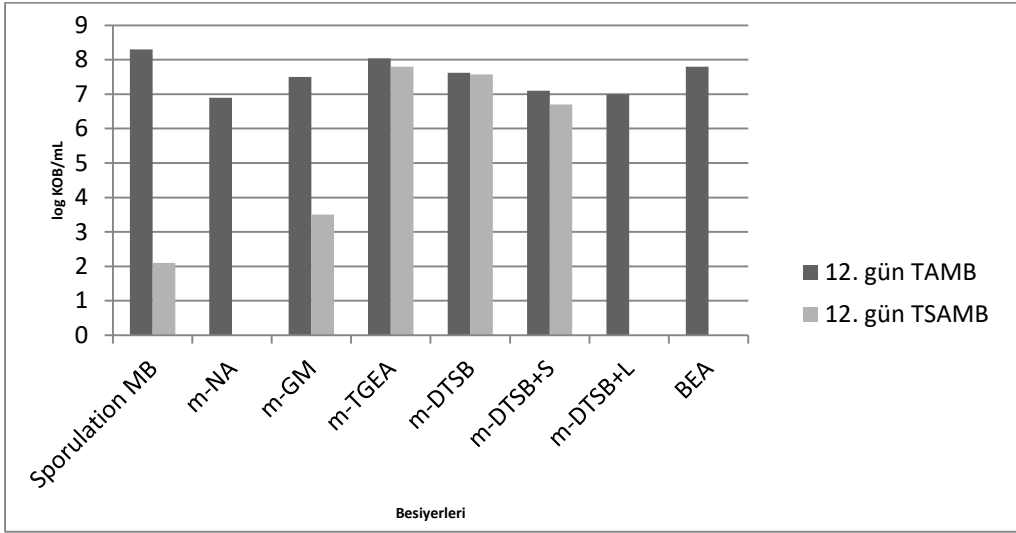


Şekil 1. Çeşitli sporlandırma besiyerinde 5 gün inkübasyon sonucunda TAMB ve TSAMB sayısı

Figure 1. TAMB and TSAMB number in various media after 5 days of incubation

SPMB: sporulation medium broth, m-NA: modifiye nutrient agar, m-GM: modifiye G medium, m-TGEA: modifiye tryptone glucose extract agar, m-DTSB: modifiye %10 seyreltilmiş TSB agar, m-DTSB+S: modifiye DTSB agar + sakkaroz, m-DTSB+L: modifiye DTSB agar + laktöz, BEA: beef extract agar

SPMB: sporulation medium broth, m-NA: modified nutrient agar, m-GM: modified G medium, m-TGEA: modified tryptone glucose extract agar, m-DTSB: modified %10 diluted TSB agar, m-DTSB+S: modified DTSB agar + saccharose, m-DTSB+L: modified DTSB agar + lactose, BEA: beef extract agar

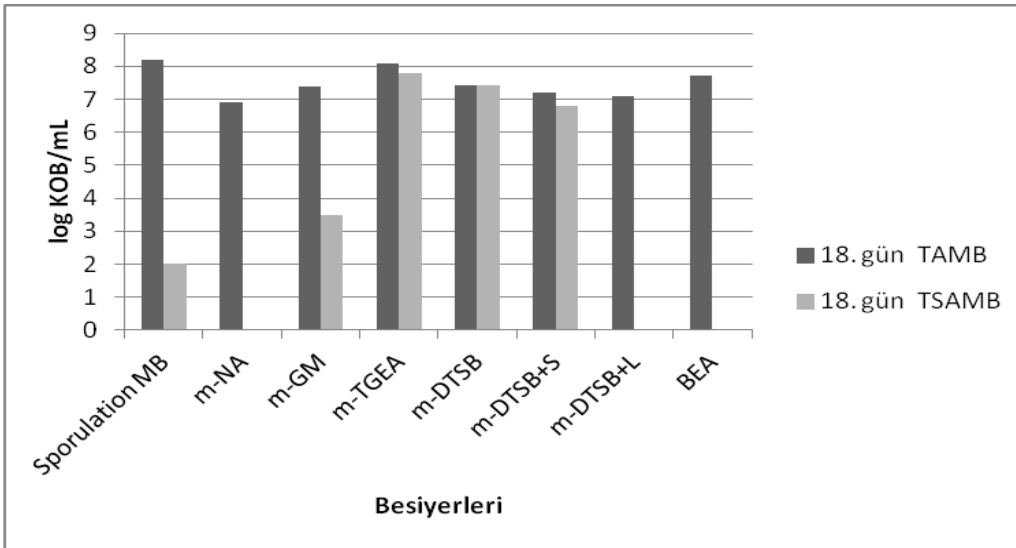


Şekil 2. Çeşitli sporlandırma besiyerinde 12 gün inkübasyon sonucunda TAMB ve TSAMB sayısı

Figure 2. TAMB and TSAMB number in various media after 12 days of incubation

SPMB: sporulation medium broth, m-NA: modifiye nutrient agar, m-GM: modifiye G medium, m-TGEA: modifiye tryptone glucose extract agar, m-DTSB: modifiye %10 seyreltilmiş TSB agar, m-DTSB+S: modifiye DTSB agar + sakkaroz, m-DTSB+L: modifiye DTSB agar + laktoz, BEA: beef extract agar

SPMB: sporulation medium broth, m-NA: modified nutrient agar, m-GM: modified G medium, m-TGEA: modified tryptone glucose extract agar, m-DTSB: modified %10 diluted TSB agar, m-DTSB+S: modified DTSB agar + saccharose, m-DTSB+L: modified DTSB agar + lactose, BEA: beef extract agar



Şekil 3. Çeşitli sporlandırma besiyerinde 18 gün inkübasyon sonucunda TAMB ve TSAMB sayısı

Figure 3. TAMB and TSAMB number in various media after 18 days of incubation

SPMB: sporulation medium broth, m-NA: modifiye nutrient agar, m-GM: modifiye G medium, m-TGEA: modifiye tryptone glucose extract agar, m-DTSB: modifiye %10 seyreltilmiş TSB agar, m-DTSB+S: modifiye DTSB agar + sakkaroz, m-DTSB+L: modifiye DTSB agar + laktoz, BEA: beef extract agar

SPMB: sporulation medium broth, m-NA: modified nutrient agar, m-GM: modified G medium, m-TGEA: modified tryptone glucose extract agar, m-DTSB: modified %10 diluted TSB agar, m-DTSB+S: modified DTSB agar + saccharose, m-DTSB+L: modified DTSB agar + lactose, BEA: beef extract agar

Çizelge 1. Sporlandırma besiyerlerinde 5, 12 ve 18 gün inkübasyon sonunda %TSAMB/TAMB oranları

Table 1. % TSAMB/TAMB ratio at the end of 5, 12 and 18 days of incubation in sporulation media.

Besiyeri <i>Medium</i>	5. gün <i>5th day</i>	12. gün <i>12th day</i>	18. gün <i>18th day</i>
SPMB	NS	<1	<1
m-NA	NS	NS	NS
m-GM	<1	<1	<1
m-TGEA	58	60.9	61
m-DTSB	NS	91.2	92
m-DTSB+S	NS	39.8	65.5
m-DTSB+L	NS	NS	NS
BEA	NS	NS	NS

SPMB: sporulation medium broth, m-NA: modifiye nutrient agar, m-GM: modifiye G medium, m-TGEA: modifiye tryptone glucose extract agar, m-DTSB: modifiye %10 seyreltilmiş TSB agar, m-DTSB+S: modifiye DTSB agar + sakkaroz, m-DTSB+L: modifiye DTSB agar + laktöz, BEA: beef extract agar

NS: Sporlanma gerçekleşmedi.

SPMB: *sporulation medium broth*, m-NA: *modified nutrient agar*, m-GM: *modified G medium*, m-TGEA: *modified tryptone glucose extract agar*, m-DTSB: *modified %10 diluted TSB agar*, m-DTSB+S: *modified DTSB agar + saccharose*, m-DTSB+L: *modified DTSB agar + lactose*, BEA: *beef extract agar*

NS: *No sporulation*

En hızlı sporlanma 5 gün sonunda %58 oranla m-TGEA'da gerçekleşirken 18 gün inkübasyon sonucunda en yüksek spor oranı %92 ile m-DTSB besiyeri en verimli besiyeri olarak seçilmiştir. m-DTSB'den elde edilen sporlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Besiyerlerinde sporlanmanın uzun sürmesi, besiyerindeki besin maddelerinin bakteriler tarafından tüketilmesine bağlıdır. İçeriği çok zengin olmayan m-TGEA'daki besin maddeleri daha hızlı tüketilmiş, sporlanma hızlı gerçekleşmiştir. 12-18. gün arasında önemli değişim olmaması da 12. günde besin maddelerinin tükenmiş, sporlanmanın gerçekleşmiş olmasından kaynaklıdır.

Bu çalışmada kullanılan besiyerlerinden m-GM, Hornstra vd. (2007) tarafından *B. cereus* ATCC 14579 ve *B. cereus* CMCC 3328 suşlarını sporlandırmak amacıyla kullanmıştır. Araştırmacılar, bakteri sporlarını yıkayarak hasat etmiş ve mikroskopik gözlem ile 10^7 spor/mL düzeyinde spora ulaşıldığını bildirmişlerdir. Peng vd. (2001) m-TGEA, m-DTSB, m-DTSB+S, m-DTSB+L besiyerlerinde *B. cereus* sporlandırıdıklarında ise 30 °C'ta 10-18 gün inkübasyon sonucunda mikros-

kobik gözlem ile 10^8 spor/mL düzeyine ulaşmışlardır. Collado vd. (2006), *B. cereus*'u SPMB besiyerinde 4 günde sporlandırmış, mikroskopik gözlem ile %95 verim elde etmiştir. Tarafımızca yapılan bu çalışmada mikroskopik değil, standart kültürel yöntemler kullanılmış ve sonuçlar, m-GM'de 5×10^3 spor/mL, m-TGEA'da 8×10^7 spor/mL, m-DTSB'de 4×10^7 spor/mL, m-DTSB+S'de 8×10^6 spor/mL, m-DTSB+L'de <100 spor/mL ve SPMB besiyerinde ise 1×10^2 spor/mL (verim: $<1\%$) olarak bulunmuştur. Kültürel sayım yöntemlerinin mikroskopik sayım yöntemlerine göre avantajı sadece canlı hücrelerin sayılmasıdır (Anonim 2005). Dolayısıyla, elde edilen verimlerin literatürle olan farklılıklarının canlı spor sayısının belirlenmesinden ileri geldiği söylenebilir.

Islam vd ise m-NA'da *B. subtilis*, *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus* sporlandırmış, spor suspansiyonunda 10^{7-9} spor/mL sonucuna ulaşmıştır. Bu çalışmada ise m-NA'da sporlanma gerçekleşmemiştir. Bu durum sporlandırılmaya çalışılan mikroorganizmaların farklı türler olmasından ileri gelebilir.

Warda vd. (2015) çalışmasında *B. cereus* ATCC 14579 suşunu, Garcia vd. (2010) tarafından belirlenen MSM Broth (nutrient broth (NB, Difco, the Netherlands, 8 g/l), maltoz (10 mM), CuCl₂ (12.5 µM), ZnCl₂ (12.5 µM), MnSO₄ (66 µM), MgCl₂ (1 mM), (NH₄)₂SO₄ (5 mM), Na₂MoO₄ (2.5 µM), CoCl₂ (2.5 µM), Ca(NO₃)₂ (1 mM) and FeSO₄ (1 µM)) besiyerinde sporlandırmıştır. Faz kontrast mikroskopisiyle elde edilen sonuçlar, 30°C'ta 2-3 gün içinde % 99'un üzerinde sporlanma olduğunu göstermiştir.

Hayrapetyan vd. (2016)'da *B. cereus* ATCC 10987 ve *B. cereus* NIZO 4080 suşlarının ısı direncini kuru veya ıslak formda biyofilmlerde polistiren ve paslanmaz çelik yüzeylerde araştırmıştır. *B. cereus* ATCC 10987 suşu için maksimum sporlanmaya Y1 besiyerinde (İçeriği: D-glikoz (10 mM), L-glutamik asit (20 mM), L-lösin (1.2 mM), L-valin (0.52 mM), L-treonin (0.28 mM), L-metionin (0.1 mM), L-histidin (0.06 mM), sodyum-DL-laktat (5 mM), asetik asit (1 mM), FeCl₃ (50 mM), CuCl₂ (2.5 mM), ZnCl₂ (12.5 mM), MnSO₄ (66 mM), MgCl₂ (1 mM), (NH₄)₂SO₄ (5 mM), Na₂MoO₄ (2.5 mM), CoCl₂ (2.5 mM), ve Ca(NO₃)₂ (1 mM)), 30°C'ta 5. gün inkübasyon sonucunda yaklaşık %90 verimlilikle polistiren yüzey/ kuru biyofilmden ulaşılmıştır. *B. cereus* NIZO 4080 suşu için ise maksimum sporulasyona Y1 besiyerinde paslanmaz çelik yüzey/ kuru biyofilmden yaklaşık % 90 verimlilikle ulaşılmıştır.

Tarafımızca gerçekleştirilen bu çalışmada 18 gün inkübasyon sonunda, gelişme gözlenen besiyerlerinden, sıvı besiyeri olan SPMB'nin veriminin çok düşük olduğu, katı besiyerlerinde sporlanma veriminin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Su aktivitesinin düşük olmasının sporlanma için teşvik edici bir faktör olduğu, sıvı besiyerine kıyasla, katı besiyerinde sporlanmanın çok daha kolay gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.

Daha önceki çalışmalarda sporulasyonun mangan varlığı ile desteklendiği belirtilmiştir (Charney vd., 1951; Vasantha ve Freese, 1979; Hayrapetyan vd., 2016, Mhatre vd., 2016). Bu çalışmada elde edilen verilere göre de mangan içermeyen tek besiyeri olan BEA'da spor oluşmadığı gözlenmiştir. En yüksek spor oluşumu ile m-DTSB en verimli

besiyeri seçilmiştir. m-DTSB besiyerine 10 g/L oranında eklenen laktoz ve sakkaroz, bakterilere karbon kaynağı olarak verimli bir gelişme ortamı sağlayarak sporulasyona gerek bırakmadığı düşünülmektedir. Sakkarozla kıyasla laktozun gelişimi daha fazla desteklediği, sporulasyona hiç gerek bırakmadığı görülmüştür. Laktoz içeren m-DTSB'de 18 gün sonunda sporlanma <100 KOB/mL iken, m-DTSB+S besiyerinde yaklaşık 8x10⁶ KOB/mL olarak bulunmuştur.

Sporlanmayı 18 gün inkübasyon sonunda hiç desteklememiş olan besiyerlerinden BEA'da, içerikteki mangan eksikliği sebebiyle; m-NA ve m-DTSB+L besiyerlerinde ise bileşim zenginliğinin sporulasyona gerek bırakmamasından dolayı hiç sporlu bakteri gelişimi gözlenmemiştir.

Diğer besiyerlerine kıyasla m-DTSB besiyeri içeriği, minerallerce daha zengin, karbon kaynağınca daha fakirdir. Yine aynı şekilde sporlanmanın en hızlı gerçekleştiği m-TGEA besiyerinde de karbon kaynağı düşük oranda bulunmakta ve mineral olarak sadece mangan sülfat içermektedir. Bu da mangan varlığının sporulasyonu hızlandırdığı bilgisini desteklemektedir. Besiyerlerinin içeriğinde bulunan mangan bileşiklerinin mangan klorür veya mangan sülfat halinde olması, sporulasyonu etkilememiştir. Genel bir besiyeri olan Nutrient Agar'a mangan sülfat eklenmesiyle elde edilen m-NA besiyerinde ise sporlanma gözlenmemiştir. Bu durumda besiyeri bileşiminin bakteri sporlanmasına gerek duyulmayacak kadar yeterli olduğu söylenebilir. Bir başka deyişle, sporlanma sadece kısıtlı besin maddesi ve mangan varlığında teşvik edilmektedir.

KAYNAKLAR

Abe, K., Shimizu, K., Tsuda, S, Sato, T. (2017). A novel non prophage(-like) gene-intervening element within gerE that is reconstituted during sporulation in *Bacillus cereus* ATCC 10987. *Sci Rep.* 7: 11426. DOI:10.1038/s41598-017-11796-8.

Abbas, A.A., Planchon, S., Jobin, M., Schmitt, P. (2014). A new chemically defined medium for the growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in anaerobiosis. *J Microbiol Meth* 105: 54-58.

- Anonim (2005). Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. (ed), A.K. Halkman. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., 358 s., Ankara.
- Anonymous (2016). Bacterial Endospores. Cornell University College of Agriculture and Life Sciences, Department of Microbiology. <http://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores> (Erişim tarihi: 16.05.2016).
- Arda, M. (2000). Temel Mikrobiyoloji. İkinci Baskı (Genişletilmiş). Medisan Yayın Serisi: 46. 548 s.
- Charney J., Fisher W., Hegarty C.P. (1951). Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *J Bacteriol* 62: 145.
- Collado, J., Fernandez M.R., Martinez, A. (2006). Modelling the effect of a heat shock and germinant concentration on spore germination of a wild strain of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 106: 85-89.
- De Vries, Y.P., Hornstra, L.M., de Vos, W.M., Abee, T. (2004). Growth and Sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under Defined Conditions: Temporal Expression of Genes for Key Sigma Factors. *Appl Environ Microbiol* 70(4): 2514-2519
- Garcia, D., van der Voort, M., Abee, T. (2010). Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 140: 146-153.
- Halkman, A.K. (2013). Gıda Mikrobiyolojisi II Ders notları. http://food.eng.ankara.edu.tr/wp-content/uploads/sites/256/2015/10/Halkman_g%C4%B1da_mik-2_gdm310.pdf (Erişim tarihi: 11.01.2018).
- Hayrapetyan, H., Muller, L., Tempelaars, M., Abee, T., Groot, M.N. (2015). Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. *Int J Food Microbiol*, 200: 72-79.
- Hayrapetyan, H.M., Abee, T., Nierop Groot, M. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control* 60: 493-499.
- Hornstra, L.M., de Leeuw P.L.A, Moezelaar R., Wolbert E.J., de Vries Y.P., Vos W.M., Abee T. (2007). Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. *Int J Food Microbiol* 116: 367-371.
- Hussain, M. S. ve Oh, D. H. (2018). The impact of isolation source in the biofilm formation characteristics of *Bacillus cereus*. *J Microbiol Biotechnol.* 28(1): 77-86. doi:10.4014/jmb.1707.07023.
- Islam, M. S., Inoue, A., Igura, N., Shimoda, M., Hayakawa, I. (2006). Inactivation of *Bacillus* spores by the combination of moderate heat and low hydrostatic pressure in ketchup and potage. *Int J Food Microbiol.* 107: 124-130.
- Lakha, S.S. Velarde, C.G.L., Chen, S., Lee, S., Shannon, K., Fabri, M., Downing, G., Keown, B. (2017). A Study To Assess the Numbers and Prevalence of *Bacillus cereus* and Its Toxins in Pasteurized Fluid Milk. *J Food Prot.* 80(7): 1085-1089. doi/10.4315/0362.
- Mhatre, E., Troszok, A., Monterrosa, R.G., Lindstädt, S., Hölscher, T., Kuipers, O.P., Kovács, A.T. (2016). The impact of manganese on biofilm development of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 162: 1468-1478, doi: 10.1099/mic.0.000320.
- Organji, S.R., Abulreesh, H.H., Elbanna, K., Osman, G.E.H., Khider, M. (2015). Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. *Asian Pac Trop Biomed.* 5(7): 515-520.
- Tunail, N. (2000). *Mikrobiyel enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları.* Sim Matbaacılık Ltd., Ankara. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s. 03. Bölüm, 01. Kısım.
- Kalkan, S. (2006). Çiğ sütte *Bacillus cereus* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Pommerville, J.C. (2014). Fundamentals of Microbiology. 10th Edition, Jones & Bartlett Learning, Burlington, MA., 944 s.

Peng, J.S, Tsai, W.C., Chou, C.C. (2001). Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *Int J Food Microbiol* 65: 105-111

Van der Voort, M., Abee, T. (2013). Sporulation environment of emetic toxinproducing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. *J Appl Microbiol*, 114(4): 1201-1210.

Van Melis, C.C.J., den Besten, M.W., Nierop Groot, M.N., Abee, T. (2014). Quantification of the impact of single and multiple mild stresses on outgrowth heterogeneity of *Bacillus cereus* spores. *Int J Food Microbiol*. 177: 57-62

Vasanth, N., Freese, E. (1979). The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 112.