

***Alicyclobacillus*¹**

A. Kadir Halkman²

01. Giriş

İlk kez 1971 yılında termal su kaynağından izole edilen ve ilk aşamada *Bacillus coagulans* 'a benzerliği de dikkate alınarak *Bacillus* cinsine dahil edilen asidofilik ve termofilik sporlu bakteriler (ATSB) daha sonra genetik esaslı testler ve diğer *Bacillus* türlerinde görülmemek üzere majör nötral membran lipidi olan omega-alicyclic yağ asidi içerdiklerinin saptanması üzerine 1992 yılında *Alicyclobacillus* adı verilen cins altında toplanmışlardır. *Alicyclobacillus* adı bu yağ asidinden gelmektedir (1, 2).

Sıcak geçen 1982 yazında Almanya 'da ticari olarak paketlenmiş elma sularında o güne kadar görülmemiş bir bozulma olmuş, etmenin *Alicyc. acidoterrestris* olduğu saptanmıştır. Daha sonraki yıllarda da benzer bozulmaların görülmesi üzerine yoğun çalışmalar başlamıştır. Bu bakterinin insan sağlığı üzerinde olumsuz bir etkisi bugüne kadar saptanmamıştır. Bu aşamada sorun tümüyle ticari olarak ürünün bozulmasıdır (2, 3).

Bu gruba giren bakteriler geniş bir sıcaklık ve asidik pH aralığında gelişebilmektedirler. *Alicyc. acidocaldiarius*, *Alicyc. acidoterrestris* ve *Alicyc. cycloheptanicus* olmak üzere 3 türü vardır. Bunlardan özellikle *Alicyc. acidoterrestris* meyve sularında bulanıklık, ve petrol kokusu olarak tanımlanan guaiacol oluşturmaları ile sorun çıkarmaktadır (1, 4).

Bugün sadece meyve sularında değil, hammadde olarak meyve, meyve suyu konsantreleri, gıda işletmeleri proses suyu, salça ve soslar, çeşitli şuruplar, meyve çayları vb. ürünlerde mikrobiyolojik analizler ile *Alicyc. acidoterrestris* aranmakta ya da sayılmaktadır (2, 5).

Kromatografik yöntemlerle doğrudan guaiacol analizi söz konusu ise de mikrobiyolojik olarak yapılan testler uluslararası platformda kabul görmektedir (6).

¹ [Meyve Suyu Endüstrisi Derneği](#) (MEYED) yayın organı olan "Meyve Suyu" adlı bültende Ekim Aralık 2004 Yıl: 2, Sayı: 8, sayfa 5-6 'da aynı makale adı ve aynı yazar adı ile yayınlanmış olan bu makale, MEYED 'in izni ile burada bir kez daha yayınlanmaktadır.

² Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-Posta adresi: halkman@tr.net

02. Mikrobiyolojik Analiz

Mikrobiyolojik analizin esası bu bakterinin sporlu, termofilik ve asidofilik olması üzerine kuruludur. Buna göre, esas olarak materyal pastörize edilir, asitli bir ortamda ve yüksek sıcaklıkta inkübe edilir. Herhangi bir gelişme görülmez ise ATSB ve dolayısı ile *Alicyc. acidoterrestris* yoktur şeklinde rapor verilir. Gelişme görülür ise sadece ATSB varlığı belirlenmiş olur ve genel olarak bunun *Alicyc. acidoterrestris* olacağı kabul edilir. Ancak bunun sadece bir genel kabul ediş olduğu gözden uzak tutulmamalıdır (1, 7).

İnkübasyon parametreleri ve kullanılacak besiyeri üzerinde uzun süreli araştırmalardan sonra $45\pm 0,1$ °C 'da 3–5 gün süren inkübasyon ile pH 'sı H_2SO_4 ile $4,0\pm 0,2$ 'ye ayarlanmış BAT Medium ve BAT Agar besiyeri üzerinde karar kılınmış ve 2004 yılında 12 nolu yöntem olarak IFU da bu besiyerlerini standart analizde kullanılacak besiyeri olarak göstermiştir (5).

Meyve suyu sektörünü ilgilendirmek üzere *Alicyc. acidoterrestris*, sporlu ya da sporsuz bakterilerin potansiyel varlığına göre farklı şekillerde analiz edilir. Ayrıca sayım ve var/ yok testleri, materyalin membran filtreden geçirilip geçirilememesi gibi özellikleri de analiz yönteminde farklılıklara neden olur (5, 7).

Bununla beraber, *Alicyc. acidoterrestris* analizinde 2 temel yaklaşım spor formundaki ve vejetatif formdaki bakterilerin analizidir. Bu bakterinin vejetatif formda olması beklenen pazara verilmiş olan son ürün meyve sularının analizinde hiçbir şekilde pastörizasyon uygulanmamalıdır. Ancak hammadde ve konsantreler gibi bakterinin spor formunda olduğu beklenen materyalde hem sporlu bakteri analizi hem de vejetatif bakteri analizi yapılması önerilir (1, 5, 7).

Alicyc. acidoterrestris analizi IFU standardı ağırlıklı olarak aşağıda açıklanmıştır (5).

02.01. Sporsuz Bakteri Analizi

Öncelikle pazara sunulan meyve suları ısıt işlemden geçirilmiş oldukları için bunlarda spor formundan ziyade vejetatif hücrelerin bulunması doğaldır. Dolayısı ile bu ürünlerin pastörize edildikten sonra analiz edilmeleri halinde vejetatif bakteriler ölecekleri için sonuç "yok" olarak alınacaktır. Bu gibi sahte negatif sonuçlardan kaçınmak için pazara sunulmuş meyve sularının *Alicyc. acidoterrestris* analizinde pastörizasyon uygulanmaz. Sayım yapılması isteniyorsa materyalin membran filtreden geçirilip geçirilemeyeceğine göre analizin duyarlılığı değişir (5, 7).

Sayım için materyal membran filtreden geçirilebiliyorsa istenen (standart olarak en fazla 10 mL) miktarda meyve suyu filtreden geçirilip, membran filtre BAT Agar besiyeri üzerine yerleştirilir, $45\pm 0,1$ °C 'da 3–5 gün süren inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılır. İnkübasyonun 3. gününde Petri kutuları kontrol edilir. koloni gelişmesi varsa Petri kutusu değerlendirmeye alınır. 3. gün koloni gelişmesi olmamış ise inkübasyona 5. güne kadar devam edilir. Oluşan koloniler den en az 10 adedi doğrulanır. Koloni sayısı 10 'dan daha az ise tümü doğrulanır (5, 7).

Materyal filtreden geçirilemiyor ise doğrudan 0,1 mL BAT Agar besiyeri üzerine yayılır. 1 mL örnek ile çalışılması gerekiyorsa 14 cm çaplı Petri kutularına dökülmüş BAT Agar besiyerine doğrudan 1 mL ya da standart Petri kutularına dökülmüş 3 Petri kutusundaki BAT Agar besiyerine 1 mL materyal olabildiğince eşit olarak dağıtılıp yayılır. İnkübasyon ve değerlendirme yukarıda verildiği şekildedir (5, 7).

Yine pazara sunulmuş meyve sularının var/ yok analizlerinde materyal orijinal ambalajında $45 \pm 0,1$ °C 'da 7 gün inkübe edilir. Bu süre sonunda 0,1 mL örnek BAT Agar besiyerine sürülür, inkübasyon ve değerlendirme yukarıda verildiği şekildedir (5, 7).

02.02. Sporlu Bakteri Analizi

Hammadde ile aseptik olarak doldurulmamış ve uzun süre depolanmış meyve suyu konsantrelerinde sporlu bakterilerin varlığı beklenir. Buna paralel olarak materyalin önce pastörizasyonu, böylece vejetatif hücrelerin ortadan kaldırılması, sadece spor formundaki bakterilerden termofilik ve asidofilik olanların varlığının belirlenmesi bu analizin temel ilkesidir. Aseptik olarak doldurulduğu halde uzun süre beklemiş olan konsantrelerde gerek sporlu gerek sporsuz bakteri ilkesi ile paralel analiz önerilir (5, 7).

Yöntemin esası materyalin 80 °C 'da 10 dakika süre ile pastörize edilip, hızla 45 °C 'a soğutulması ve analizin yukarıda sporsuz bakteri analizinde verilen ilkeler çerçevesinde devam etmesidir. Kuşkusuz, materyale göre analizde küçük de olsa bazı farklılıklar vardır:

-10 g hammadde 90 mL Maximum Recovery Diluent (saline-pepton ; %0,85 NaCl + %0,1 pepton) ortamında homojenize edilir, pastörizasyon bu homojenizata uygulanır (5,7).

-Prosesin ısı işlem öncesindeki herhangi bir aşamasından alınan meyve suyuna da aynı yöntem uygulanır.

-Sonraki sayım, var/ yok testleri membran filtreden geçirilebilen/ geçirilemeyen materyalin analizi yukarıda sporsuz bakterilerin analizinde olduğu gibidir. Ancak; var/ yok testlerinde inkübasyon tartışma konusudur: IFU 'ya göre homojenizasyon BAT Medium (agarsız BAT besiyeri) 'da yapılıp, pastörizasyondan sonra homojenizat inkübe edilmelidir. Oysa BAT agar besiyerinin ticari formu olmakla beraber, agarsız BAT Medium 'un laboratuvar ortamında hazırlanması oldukça zordur. Bunun yerine Tryptic Soy Broth gibi bir besiyerinde homojenizasyon, pastörizasyon ve zenginleştirme yapılabilir.

02.03. Su Analizi

Basit olarak membran filtreden geçirilip, BAT Agar besiyerinde inkübe edilir (5, 7).

02.04 Doğrulama

Her ne kadar BAT Agar besiyerinde düşük pH ve yüksek inkübasyon sıcaklığı ile selektif bir ortam sağlanarak termofilik asidofilik bir bakteri olan *Alicyc. acidoterrestris*

analizi yapılıyorsa da termotolerant ve asidotolerant bakterilerin de bu ortamda gelişerek sahte pozitif sonuçlara neden olması mümkündür. Bu nedenle BAT Agar besiyerinde gelişen kolonilerin doğrulanması gerekir (5, 7).

Alicyc. acidoterrestris asidofil karakterlidir. Nötr pH 'larda gelişemez. Buna bağlı olarak BAT Agar besiyerinde gelişen kolonilerden en az 10 adet (koloni sayısı ondan az ise tümü) alınarak ayrı ayrı Plate Count Agar (PCA) besiyerine sürülür. 45 °C 'da 3-5 gün yapılan inkübasyon sonunda PCA besiyerinde gelişen koloniler *Alicyc. acidoterrestris* değildir. Asidofilik bakteriler nötr pH 'lı besiyerinde gelişemez. PCA besiyerinde gelişmeyen kolonilerin *Alicyc. acidoterrestris* olduğuna karar verilir (5, 7).

DNA-DNA homolojisi ve 16S ribozomal DNA analizleri vb. genetik esaslı testler ile kesin tanımlama yapılabilmektedir (1, 5).

02.05. BAT Agar

Bileşimi maya ekstraktı 2,0 g/L ; D(+) glikoz 5,0 g/L ; CaCl₂ 0,25 g/L ; MgSO₄ 0,5 g/L ; Amonyum sülfat 0,2 g/L ; KH₂PO₄ 3,0 g/L ; agar 18,0 g/L ; iz elementler olarak CaCl₂ 0,00066 g/L ; ZnSO₄ 0,00018 g/L ; CuSO₄ 0,00016 g/L ; MnSO₄ 0,00015 g/L ; CoCl₂ 0,00015 g/L ; Borik asit 0,00010 g/L ; Sodyum molibdat 0,00030 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 29,0 g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C 'da sterilize edilir. Besiyeri pH 'sı orijinal olarak agarın jel yapısını korumak için 5,3±0,2 'ye ayarlanmıştır. Otoklav sonrası pH 'yı 4,0±0,2 'ye düşürmek için 45–50 °C 'a soğutulan besiyerine steril 1 N H₂SO₄ 'den 1,7 mL eklenir, karıştırılıp Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı olup, buzdolabı sıcaklığında ve karanlıkta olacak şekilde 2 haftaya kadar depolanabilir. BAT Agar bütün *Alicyclobacillus* türlerinin gelişmesini destekler. Düşük pH ve yüksek inkübasyon sıcaklığı refakatçi floranın gelişimini baskılar. BAT Agar ticari olarak üretilmeye başlamıştır. Bileşimde 2 adet CaCl₂ olması bunlardan birisinin bazal besiyerinde diğerinin iz element çözeltisinde olmasından kaynaklanmaktadır. Ticari olarak üretilmiş preparatta bu şekilde gösterilme nedeni orijinal formülasyona uyulduğunun gösterilmesi içindir. Orijinal formülasyonda iz elementler bu bileşime uygun olarak ayrıca hazırlanıp, bazal besiyerine ilave edilir. BAT Medium olarak tanımlanan ve zenginleştirme amacıyla kullanılan sıvı besiyerinde agar yoktur, diğer formülasyon aynıdır (5, 7).

Teşekkür

Meyve Suyu Endüstrisi Derneği'ne yayın organları olan "Meyve Suyu" adlı bültende yayınlanmış olan bu makaleyi elektronik ortamda tekrardan yayınlama izni verdiği için teşekkür ederim.

Yararlanılan Kaynaklar

1. Doğan, H.B. 2000. *Alicyclobacillus* spp. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını s 461-464. Sim Matbaası, Ankara

2. Kaspar, V.W. 2000. *Alicyclobacillus* FRI Newsletter Food Research Institute UW-Madison Vol 12 no 3 <http://www.wisc.edu/fri/newsltr/fall00.htm#FRIR1>
3. Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., Pinhatti, M.E., Azuma, E., Variane, S.F. Study on the Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juice. Detection Methods, Ecology, and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices http://www.abecitrus.com.br/pesq_us.html
4. Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., Murphy, J.M. 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint
5. Anonymous 2004. IFU (International Federation of Fruit Juice Producers) Method no 12 First Standard IFU Method on the Detection of *Alicyclobacillus* in Fruit Juices in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Lett Appl Microbiol.* 1997 24(3):185-9.
6. Orr, R.V., Shewfelt, R.L., Huang, C.J., Tefera, S., Beuchat, L.R. 2000. *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Detection of Guaiacol Produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Apple Juice by Sensory and Chromatographic Analyses, and Comparison with Spore and Vegetative Cell Populations. *J Food Prot.* 63(11):1517-22.
7. Anonymous 2004. www.mikrobiyoloji.org