

***Bacillus cereus* 'un Standart Analiz Yöntemi¹**

Selin Kalkan², Kadir Halkman³

Giriş

Bacillus cereus, insan patojeni olmak yanında salgıladığı proteaz enzimi ile özellikle UHT sütlerde sorun çıkararak bir bakteridir (1). Buna bağlı olarak gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında sayım ya da arama şeklinde analizi yapılır.

Bu derlemede *Bacillus cereus* 'un standart analiz yöntemleri ve kullanılan besiyerleri kıyaslamalı olarak verilmiştir.

Selektif Besiyerine Ekim ve İzolasyon

İşletme laboratuvarlarında *B. cereus* 'un rutin analizleri için Cereus Selective Agar; MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Agar ve *Bacillus cereus* Selective Agar; PEMBA (Polymyxin Egg Yolk Mannitol Bromthymol Blue Agar) olmak üzere iki ticari seçici besiyeri yaygın olarak kullanılmaktadır (2).

Çiğ sütlerden genellikle 10^2 ile 10^6 arasında hazırlanan seri dilüsyonlardan MYP Agar besiyerine ekim yapılarak 30-35 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır veya PEMBA'da 37 °C'de 24 saat inkübasyon ve ardından da oda sıcaklığında 24 saat bekletme yapılır. MYP besiyeri, *B. cereus* 'un lesitinaz aktivitesi ve mannitol fermantasyonu olmak üzere iki tipik reaksiyonu belirlemek üzere geliştirilmiştir (3).

B. cereus sayısının az olduğu tahmin edilen sıvı gıdalarda doğrudan, katı veya yarı katı gıdalarda ise 10^1 dilüsyonlardan ekim yapılır. Böyle ürünlerde bakteriyi saptama oranını artırmak için 140 mm çaplı büyük Petri kutularına 1 ml inokülüm aktararak da ekim yapılır (2).

B. cereus, mannitol negatif olduğu için MYP Agar besiyerinde pembe koloniler oluştururken, lesitinaz aktivitesi nedeni ile de koloni etrafında presipitasyon (çökeltme) halkası oluşumuna neden olur. Ancak bu besiyerinde bazı dezavantajlar da vardır. İncelenecek gıda maddesinde mannitolü fermente ederek asit oluşturabilen farklı mikroorganizma grupları mevcut ise, *B. cereus* kolonilerinin karakteristik pembe

¹ Yüksek Lisans seminerinden derlenmiştir.

² Gıda Mühendisi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi, Dışkapı Ankara

³ Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: halkman@eng.ankara.edu.tr

renkleri azalır veya tamamıyla kaybolur. Bazı *Bacillus* türleri, çok az lesitinaz üretir veya hiç üretmezler. Bu türlere ait kolonilerin etrafında presipitasyon halkası gözlenmez (4).

Bacillus cereus, PEMBA üzerinde pürüzlü, mumsu, turkuaz mavimsi renkte koloniler oluşturur. Bu koloniler lesitinaz aktivitesine bağlı olarak aynı renkli bir presipitasyon halkası ile çevrilidir (2).

En düşük dilüsyondan ekim yapılmış olan Petri kutularındaki karakteristik koloni sayısı 15'den az olarak tahmin ediliyor ise EMS yöntemi kullanılarak da sayım yapılabilir. Bu amaçla FDA (Food and Drug Administration) tarafından belirtilen yöntem göre Trypticase Soy Polymyxin Broth içeren tüplere inokülasyon yapılarak, 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. *B. cereus* için tipik olan yoğun gelişme gözlenir. Pozitif tüplerden MYP Agar besiyerine alınarak, 30 °C'de 24-48 saat inkübe edilir. Burada oluşan tipik koloniler *B. cereus* doğrulaması için Nutrient Yatık Agar besiyerine alınarak biyokimyasal testlere geçilir (4).

Biyokimyasal İdentifikasyon

İdentifikasyon için her bir MYP Agar besiyerinden *B. cereus* olduğu tahmin edilen 5 veya daha fazla sayıda pembe renkli, lesitinaz pozitif koloni seçilir. Petri kutusundaki koloni sayısı 5 adetten az ise, bulunan muhtemel kolonilerin tamamı alınır. Koloniler çok sayıda ve yığın halinde olup tek koloni seçimi mümkün değilse, MYP Agar besiyerinde bulunan 5 şüpheli koloniden tek koloni düşürebilmek için sürme yapılarak 30 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır ve ardından muhtemel koloniler seçilir (4).

Bacillus cereus identifikasyonunda uygulanan biyokimyasal testler ve bu testlerde *Bacillus cereus* 'un gösterdiği reaksiyonlar Çizelge 1 'de özetlenmiştir.

Çizelge 1. *Bacillus cereus* 'un biyokimyasal test sonuçları (5).

Gram reaksiyonu	+	% 7,5 NaCl	G
Katalaz	+	Karbohidratlar	
Nitrat redüksiyonu	+	Glikoz	+
Spor oluşumu		Arabinoz	-
Elipsoidal	+	Mannitol	-
Toparlak	-	Ksiloz	-
Merkezi	+	Jelatin sıvılaştırma	-
Terminal veya subterminal	-	İndol	-
B- hemolizis % SBA	V ⁿ	Lesitinaz	+
Kapsül	-	Simmons sitrat	+
Hareketlilik	V*	Nişasta hidrolizi	+
OF glikoz	F	Üreaz	V
Gelişme		Voges- Proskauer °	+
Anaerobik	G		

V: Değişken; V*: değişken, genellikle pozitif; G: gelişme; SBA, Sheep Blood Agar; ⁿ: %5 Sheep Blood Agarda β- hemolizis; °: 37 °C'de 24 saat inkübasyon

Hızlı Analiz Yöntemleri

B. cereus aranmasında daha kısa sürede sonuç veren "*Bacillus cereus* Enterotoksin Test Kiti (BCET-RPLA)" önerilmektedir. Bu kit gıdalarda ve kültür filtratlarında *B. cereus* enterotoksininin pasif lateks aglütinasyon yoluyla belirlenmesi için hazırlanmıştır. RPLA tekniği bakteri toksinleri gibi çözülebilir antijeni belirleyen bir aglütinasyon tekniğidir (4).

Hızlı analizlerde önerilen bir diğer test kiti de "ELISA-VIA Enterotoksin Test Kiti"dir. Bu test kiti de lateks aglütinasyon yoluyla *B. cereus* enterotoksinini belirlenmektedir (6).

***Bacillus cereus* Analizlerinde Kullanılan Bazı Modifiye Besiyerleri**

***Bacillus cereus* Medium (BCM)**

Besiyeri bileşimi (110 ml için)

D- Mannitol 1,0 g; (NH₄)₂PO₄ 0,1 g; KCl 0,02 g; MgSO₄.7H₂O 0,02 g; Maya ekstraktı 0,02 g; Bromkresol moru 0,4 g; Yumurta sarısı emülsiyonu 10,0 ml; Agar 2,0 g; Damıtık su 100 ml

Yumurta sarısı emülsiyonu, %20 ;

Bileşim

Tavuk yumurtası sarısı 11 adet; bütün tavuk yumurtası 1 adet; % 9 'luk NaCl çözeltisi 80.0 ml

Yumurta sarısı emülsiyonunun hazırlanması, %20 : 1:100 dilüsyonda hazırlanan cıva klorür solüsyonunda yumurtalar en az 1 dakika bırakılıp, ıslatılır. Yumurtalar kırılarak sarısı ve beyazı ayrılır.Yumurta sarıları bir bütün tavuk yumurtası ile karıştırılır. Yumurta sarısı emülsiyonunun 20,0 ml'si ölçülür ve üzerine 80,0 ml % 0,9'luk NaCl solüsyonu eklenir. Tamamen karıştırılır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir. 45-50 °C'ye ısıtılır.

Besiyerinin hazırlanması: Yumurta sarısı emülsiyonu hariç bütün bileşenler eklenir ve üzerlerine 100 ml damıtık su ilave edilir. Yavaş ısıtma ile kaynatılır. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. 10,0 ml yumurta sarısı emülsiyonu aseptik olarak eklenir. Tamamen karıştırılır. Steril Petri kutularına veya tüplere dağıtılır.

Bu besiyeri *B. cereus* 'un geliştirilmesinde kullanılır.

***Bacillus cereus* Selective Agar Base**

Besiyeri bileşimi (1 Litre için)

Sodyum piruvat 10,0 g; Mannitol 10,0 g; Na₂HPO₄ 2,5 g; NaCl 2,0 g; Pepton 1,0 g; KH₂PO₄ 0,25 g; Bromotimol mavisi 0,12 g; MgSO₄.7H₂O 0,1 g; Yumurta sarısı emülsiyonu 25,0 ml; Polimiksin B çözeltisi 10,0 ml; Agar 15,0 g; Damıtık su 965 ml

Yumurta sarısı emülsiyonu;

Bileşim

Tavuk yumurtası sarısı 11 adet; bütün tavuk yumurtası 1 adet

Yumurta sarısı emülsiyonunun hazırlanması: 1:100 dilüsyonda hazırlanan cıva klorür solüsyonunda yumurtalar en az 1 dakika bırakılıp, ısıtılır. Yumurtalar kırılarak sarısı ve beyazı ayrılır. Yumurta sarıları bir bütün tavuk yumurtası ile karıştırılır.

Polimiksin B çözeltisi;

Bileşim (10,0 ml için)

Polimiksin B 100,000 U; Damıtık su 10,0 ml

Polimiksin B çözeltisinin hazırlanışı: Polimiksin B, 10,0 ml damıtık su eklenerek tamamen karıştırılır ve filtreden geçirilerek sterilize edilir.

Besiyerinin hazırlanışı: Yumurta sarısı emülsiyonu ile Polimiksin B çözeltisi hariç bütün Bileşenler 965 ml damıtık su eklenerek karıştırılır. Yavaş ısıtma ile kaynatılır. Tüplere dağıtılır. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. 50 °C'ye soğutulur. 10,0 ml steril Polimiksin B çözeltisi ve 25,0 ml yumurta sarısı emülsiyonu aseptik olarak eklenir. Tamamen karıştırılır. Steril Petri kutularına dağıtılır veya tüplerde kalır.

Bu besiyeri *B. cereus* 'un seçilmesinde ve identifikasyonunda olduğu gibi ayrıca izolasyonunda ve sayılmasında da kullanılmaktadır. *B. cereus* bu besiyerinde 5 mm çaplı turkuaz renkli koloniler oluşturmaktadır. Koloni etrafındaki çökeltme halkası da turkuaz renktedir.

***Bacillus cereus* Motility Medium**

Besiyeri Bileşim (1 Litre için)

Pankreatik enzimlerle parçalanmış kazein 10,0 g; Glikoz 5,0 g; Na₂HPO₄ 2,5 g; Maya ekstraktı 2,5 g; Agar 3,0 g ; Damıtık su 1000 ml

Besiyerinin hazırlanması: Bileşenler eklenerek 1000 ml damıtık su ile tamamen karıştırılır. Yavaş ısıtma ile kaynatılır. 2 'şer ml olarak tüplere dağıtılır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

Bu besiyeri *B. cereus* 'un geliştirilmesi ve hareketliliğinin tespitinde kullanılmaktadır.

G Medium

Besiyeri bileşimi (1 litre için)

(NH₄)₂SO₄ 2,0 g; Maya ekstraktı 2,0 g; Glikoz 1,0 g; K₂HPO₄ 0,6 g; KH₂PO₄ 0,4 g; MgSO₄ .7 H₂O 0,2 g; CaCl₂ 0,08 g; MnSO₄.H₂O 0,05 g; CuSO₄.5 H₂O 5,0 mg; ZnSO₄.7 H₂O 5,0 mg ; FeSO₄.7 H₂O 0,5 mg ; damıtık su 1000 ml

Besiyerinin hazırlanışı: Bileşenler eklenerek 1000 ml damıtık su ile tamamen karıştırılır. Tüp veya erlenlere dağıtılır. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır.

Bu besiyeri *B. cereus* 'un geliştirilmesi ve muhafaza edilmesinde kullanılmaktadır.

Heart Infusion Agar

Besiyeri bileşimi (1 Litre için)

Sığır kalbi 500,0 g; Triptoz 10,0 g; NaCl 5,0 g; Agar 15,0 g; Damıtık su 1000 ml

Besiyerinin hazırlanışı: Bileşenler eklenerek 1000 ml damıtık su ile tamamen karıştırılır. Yavaş ısıtma ile kaynatılır. Tüplere veya erlenlere dağıtılır. 121 °C'de minimum 15 dakika otoklavlanır. Steril Petri kutularına aktarılır veya tüplerde bırakılır.

Bu besiyeri *B. cereus* 'un geliştirilmesinde ve saklanması için kullanılabilmektedir.

Kim- Goepfert Agar (KG Agar)

Besiyeri bileşimi (1 Litre için)

Çözelti A 900,0 ml ; Yumurta sarısı emülsiyonu (%50) 100,0 ml; Polimiksin B çözeltisi 1,0 ml

Çözelti A;

Bileşim (900 ml için)

Pepton 1,0 g; Maya ekstraktı 0,5 g; Fenol kırmızı 0,025 g; Agar 18,0 g; Damıtık su 900 ml

Çözelti A'nın hazırlanışı: Bileşenler eklenerek 900,0 ml damıtık su ile tamamen karıştırılır. pH 6,8'e ayarlanır. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. 45-50 °C'ye soğutulur.

Yumurta sarısı emülsiyonu, % 50 ;

Bileşim (100,0 ml için)

Tavuk yumurtası sarısı 11 adet; Bütün tavuk yumurtası 1 adet; % 9 'luk NaCl çözeltisi 50,0 ml

Yumurta sarısı emülsiyonunun hazırlanışı, % 50 : 1:100 dilüsyonda hazırlanan cıva klorür solüsyonunda yumurtalar minimum 1 dakika bırakılıp, ısıtılır. Yumurtalar kırılıp sarısı ile beyazı ayrılır. Yumurta sarılarına bir bütün tavuk yumurtası eklenir. 50,0 ml yumurta sarısı ölçülür ve 50,0 ml % 9 'luk NaCl solüsyonu ilave edilir. Tamamen karıştırılır. Filtre ile yapılan sterilizasyon sonrası 45-50°C'ye ısıtılır.

Polimiksin B çözeltisi;

Bileşim (5 ml için)

Polimiksin B 500,000 U ; Damıtık su 5 ml

Polimiksin B çözeltisinin hazırlanışı: Polimiksin B, 5 ml damıtık su ilavesi ile tamamen karıştırılır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.

Besiyerinin hazırlanışı: 900,0 ml soğutulmuş steril Çözelti A içerisine aseptik olarak steril 100,0 ml yumurta sarısı emülsiyonu ve steril 1,0 ml Polimiksin B çözeltisi ilave edilir. Tamamen karıştırılır. Steril Petri kutularına aktarılır. Kullanılmadan önce besiyeri 30 °C'de 24 saat karanlıkta bekletilmelidir.

Bu besiyeri *B. cereus* 'un ayırt edilmesi ve geliştirilmesinde kullanılmaktadır.

Yukarıda bahsedilen besiyerleri dışında Lizozim Broth, Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar, Mannitol Yolk Polymyxin Agar (MYP Agar), Motility Medium, Organic Medium, Polymyxin Pruvate Egg Yolk Mannitol Bromthymol Blue Agar (PEMBA), S Broth, Trypticase Soy Polymyxin Broth, Smith, Gordon ve Clark tarafından modifiye edilmiş VP Broth gibi modifiye besiyerleri de bulunmakta ve *B. cereus* 'un analizlerinde kullanılmaktadır (7).

Kaynaklar

1. Kalkan, S., Halkman, A.K. 2006. *Bacillus cereus* ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi (2006)04 (01)1-11 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702060101.pdf
2. Tunail, N. 2000. Mikrobiyal Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, 102. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
3. Pichhardt, K. 2004. Gıda Mikrobiyolojisi Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. 176-178. Literatür Yayınları. Manisa.
4. Kaleli, D. ve Özkaya , F. 2000. *Bacillus cereus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, 395-401. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
5. MacFaddin, J. F. 1999. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. Third Edition. 589 s.
6. Pirttijarvi, T. 2000. Contamination Aerobic Sporeforming Bacteria in the Manufacturing Processes of Food Packaging Board and Food. www.thesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/pirttijarvi/contamin.pdf Erişim tarihi: 31.12.2004.
7. Atlas, R. M. 1997. Handbook of Microbiological Media. Second Edition. 137-1530. CRR Press, Inc.