

# ***Bacillus cereus***

## [01. Genel Bilgiler](#)

### [02. Sayılması](#)

### [03. İdentifikasyonu](#)

#### [03.01 Glikoz Testi](#)

#### [03.02. VP Testi](#)

#### [03.03. Nitrat Testi](#)

### [04. Kullanılan Besiyerleri](#)

#### [04.01. Cereus Selective Agar Base](#)

#### [04.02. Dextrose Caseine Peptone Agar](#)

#### [04.03. MR-VP Broth](#)

#### [04.04. Nitrate Broth](#)

## **01. Genel Bilgiler**

*Bacillus cereus* aerobik spor oluşturan bir bakteridir. Toprak kökenli olması nedeni ile tarla ve bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabildiği gibi sporları nedeni ile et ve süt ürünlerinde de bulunabilir. Özellikle uzun ömürlü içme sütlerinde önemli ekonomik kayıplara neden olur. *B. cereus* 'un çok sayıda ( $>10^6/g$ ) alınması ile gıda zehirlenmesi görülür. Bu zehirlenmeler genellikle tüketilmeden önce yeteri kadar soğutulmamış gıdalarda görülür. Standart gıda analizlerinde *B. cereus* sayılması da yer almaktadır.

*B. cereus* ile ilgili olarak daha fazla genel bilgi için [burayı tıklayın](#).

## **02. Sayılması**

*B. cereus* sayımında standart olarak kullanılan besiyeri Mossel tarafından geliştirilmiş olan Mannitol Egg-yolk Polymyxine (MYP) Agar (Merck 1.05267) besiyeridir. Bu besiyeri Cereus Selective Agar adı ile de bilinir. Sayım, standart yayma kültürel sayım yöntemi ile yapılır. Bu amaçla analiz edilecek örnekte beklenen sayıya göre ardışık 2 veya 3 seyreltiden 2' şer petriye 0,1' er ml ekim yapılır, 30-32 °C' da 18-40 saat inkübe edilir. Analize alınan örnekte *B. cereus* sayısı çok az olarak tahmin ediliyor ise 14 cm çaplı büyük petri kutularına 1' er ml ekim yapılmalıdır. Büyük petri kutusu yok ise yine 1 ml ekim 3 standart petri kutusuna dağıtılarak da yapılabilir. Bu durumda söz konusu 3 petri kutusundaki toplam koloni sayısı 1 büyük petri kutusundan alınmış gibi değerlendirilir.

*B. cereus* sayılması selektif besiyerinde mannitol ve lesitin reaksiyonu ile tipik kolonilerin sayımı ve kolonilerin biyokimyasal olarak doğrulanması ile yapılır. *B. cereus* mannitol negatif olduğu için pembe renkli koloniler oluşturur. Eğer refakatçi flora içinde mannitol pozitiflerin sayısı fazla ise *B. cereus* 'un karakteristik rengi baskılanabilir. *B. cereus* lesitinaz pozitif özelliği ile besiyerinde koloni etrafında presipitasyon yapar. Bununla beraber bazı *B. cereus* suşlarında lesitin reaksiyonu azdır, bazılarında yoktur. Bu nedenle *B. cereus* için biyokimyasal identifikasyonda özellikle tipik koloniler yok ise atipik kolonilerin alınması da tavsiye edilmektedir.

*B. cereus* ile ilgili olarak daha fazla analiz bilgisi için [burayı tıklayın](#).

### 03. İdentifikasyonu

*B. cereus*, Cereus Selective Agar besiyerinde genellikle tipik koloniler oluşturur. Bununla beraber identifikasyonda *B. cereus* ile aynı gruba giren *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides* ile ayırım önemlidir. Bu amaçla en yaygın kullanılan testler glikozun anaerobik kullanımı, Voges Proskauer (VP) testi ve nitrat testidir.

Biyokimyasal testlere geçilmeden önce *B. cereus* olduğundan kuşku duyulan kolonilerin izolasyonu ve saf halde üretilmesi gerekir. Bu amaçla saf halde izole edilebilen tek koloniler 1 ml steril distile su içinde süspanse edilip Cereus Selective Agar besiyerine standart şekilde sürülmeli, inkübasyon sonunda besiyerinde saf kültür olduğu anlaşılırsa bu koloniler ile çalışmaya devam edilmelidir.

*B. cereus* ile ilgili olarak daha fazla analiz bilgisi için [burayı tıklayın](#).

#### 03.01. Glikoz Testi

Dextrose Casein-Peptone Agar (Merck 1.10860) besiyerinde yapılabilir. Tüplerde sterilize edilmiş besiyeri standart analiz yöntemine göre kullanımdan hemen önce kaynar su banyosunda tutularak eritilir ve tekrar hızla dik pozisyonda 30 °C' a soğutulur. Bu işlemde amaç besiyeri içinde bulunan oksijenin uzaklaştırılmasıdır. *B. cereus* olduğundan kuşku duyulan kolonilerden elde edilen saf agar kültüründen 1 koloni alınarak aşı iğnesi ile 1 defada Dextrose Casein-Peptone Agar besiyerine daldırma yapılır. 30 °C' da 24 saat inkübasyon sonunda tüpün tümünün sarı renk alması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. *B. cereus* bu testte pozitif sonuç verir.

#### 03.02. Voges-Proskauer Testi

MR-VP Broth (Merck 1.05712) besiyerine saf agar kültüründen alınan bir koloni aşı özesi ile aşılanır. 30 °C' da 24 saat inkübasyon sonunda standart Voges-Proskauer testi ile sonuç alınır. *B. cereus* VP pozitif bir bakteridir. VP testi için 1 ml kültür temiz bir test tüpüne alınır, üzerine 0,2 ml % 40 potasyum hidroksit (Merck 1.05033) çözeltisi, 0,6 ml %5  $\alpha$ -naftol (Merck 1.06223) çözeltisi ve birkaç kreatin kristali ilave edilir. Kuvvetlice çalkalanıp oda sıcaklığında 1 saat bırakılır. Pembe renk oluşumu VP testinin pozitif olduğunu gösterir. Reaksiyon sonucu negatif ise orijinal tüp 24 saat daha inkübe edilip tekrar VP testi yapılır. Kreatin kristalleri kullanılmadan da VP testi yapılabilir.

#### 03.03. Nitrat Testi

Nitrat Broth Merck 1.10204 besiyeri kullanılabilir. *B. cereus* olduğundan kuşku duyulan kolonilerden elde edilen saf agar kültüründen 1 koloni alınarak aşı özesi ile besiyerine inoküle edilip 30 °C' da 24 saat inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda tüpe 0,2-0,5 ml olacak şekilde birkaç damla Griess-Ilosvay's nitrit çözeltisi Merck 1.09023 ilave edilir. 15 dakika

içinde kırmızı renk oluşumu nitratın nitrite indirgenmiş olduğunu gösterir. Oluşan nitrit miktarı fazla ise renk sarıya dönüşebilir. Negatif reaksiyon alınır ise bu sonuç ya nitratın nitrite indirgenmediğini ya da nitratın indirgenmesi sonundan oluşan nitritin daha ileri aşamada nitrojen veya amonyuma indirgenmiş olduğunu gösterir. İkinci olasılık çinko tozu testi ile saptanabilir. Test tüpüne az miktarda (spatülün ucu ile ; 0,1 g kadar) çinko tozu (Merck 1.08774) ilave ettikten sonra kültür çinko tozunun çökmesi için 10 dakika kendi halinde (karıştırmadan) bırakılır. Bu süre sonunda çinko tozu etrafında pembe renk oluşumu çinko tozu reaksiyonu pozitif olarak değerlendirilir ve bu sonuç nitratın nitrite indirgenmediğini gösterir. Bir diğer deyiş ile çinko tozu reaksiyonu pozitif olduğunda nitrat testi negatif olarak değerlendirilir. Tersine olarak çinko tozu etrafında pembe renk oluşmaması bu testin negatif olarak değerlendirilmesine neden olur. Yani nitrat nitrite ve daha ileri aşamada amonyum veya nitrite indirgenmiştir. Dolayısı ile çinko tozu reaksiyonu negatif olduğunda nitrat testi pozitif olarak değerlendirilir. *B. cereus* nitratı nitrite indirger.

## 04. Kullanılan Besiyerleri

### 04.01. Cereus Selective Agar Base (Merck 1.05267)

*B. cereus* sayılmasında kullanılan bu besiyerinin hazırlanması diğer pek çok besiyeri hazırlanmasına göre katkıların ilavesi açısından farklılık gösterir. Bu besiyeri hazırlandıktan sonra ancak 3-4 gün depolanabilir. Bu nedenle 1 litre değil genellikle 500 ml olarak (40 petri) hazırlanır. Cereus Selektif Agar katkısı (Merck 1.09875) 500 ml besiyeri için 1 şişe olarak hazırlanmıştır. Ancak steril yumurta sarısı emülsiyonu (Merck 1.03784) 100 ml şişe içinde olup bu miktar 1 litre besiyeri için kullanılır. Bu durumda 450 ml olarak hazırlanan bazal besiyerine 100 ml' lik steril yumurta sarısı emülsiyonundan aseptik koşullar altında 50 ml' sinin alınıp bazal besiyerine ilave edilmesi gerekir. Her ne kadar yumurta sarısı emülsiyonu laboratuvar koşullarında taze yumurtadan hazırlanabilirse de genel kurallar çerçevesinde hazır ticari preparat kullanımı önerilir. Burada 50 ml steril yumurta sarısı emülsiyonunun bazal besiyerine ilavesinde aseptik koşullara uyulmasından başka bir sorun yoktur. Eğer kullanım miktarına bağlı olarak 1 litre besiyeri hazırlanması uygun ise kuşkusuz aşağıda verilen hazırlama şekli 43 g/l bazal dehidre besiyeri, otoklav sonrası 100 ml steril yumurta sarısı emülsiyonu ve 2 şişe selektif katkı şeklinde olmalıdır.

Besiyerinin hazırlanması için 450 ml distile su içinde 21,5 g dehidre besiyeri ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C' da 15 dakika sterilize edilir. Su banyosunda 45-50 °C' a soğutulup üzerine 50 ml steril yumurta sarısı emülsiyonu ile 1 şişe *B. cereus* selektif katkısı ilave edilir ve karıştırılarak standart petri kutularına 12,5' er ml ve/veya 14 cm çaplı büyük petri kutularına 50' şer ml dökülür. Hazırlanmış besiyeri yumurta sarısı nedeni ile bulanık ve hafif portakal renklidir. Hazırlanmış besiyeri buzdolabında 4 güne kadar depolanabilir. Besiyeri selektif katkısında bulunan polimiksin (Merck 1.09875) refakatçi florayı baskımlarken bu konsantrasyon *B. cereus* üzerinde olumsuz etki yapmaz. Eğer analiz edilecek gıdada refakatçi flora varlığı beklenmiyor ise veya bu floranın az sayıda olduğu tahmin ediliyor ise polimiksin kullanılması zorunlu değildir. *B. cereus* mannitol negatif olduğu için refakatçi flora içindeki mannitol pozitif olanlardan rahatlıkla ayrılır. *B. cereus* mannitolü kullanmadığı için kırmızı koloni oluştururken mannitol pozitif olanların koloni rengi sarı/pembedir. Besiyeri bileşimindeki yumurta sarısı ise *B. cereus*' un lesitinaz aktivitesi ile belirlenmesini sağlar. *B. cereus* lesitinaz pozitif olduğu için kolonileri etrafında beyaz bir presipitasyon meydana gelir. Çoğu *B. cereus* suşunda bu reaksiyon 18 saat gibi kısa bir süre içinde belirgin olarak izlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile katkıları ilave edilmiş olmak üzere standart boyda 930 veya 14 cm çaplı büyük

boyda 232 petri kutusu hazırlanabilir. 1 kutu 500 g dehidre besiyeri için 12 şişe 100 ml steril yumurta sarısı emülsiyonu ve 23 adet 16 şişelik selektif katkı gerekir. Bu besiyeri ile ilgili olarak daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

#### **04.02. Dextrose Caseine Peptone Agar (Merck 1.10860)**

Dehidre besiyeri 27 g/l olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir ve standart deney tüplerine 15' er ml olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121 °C' da sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve menekşe renklidir. Hazırlanmış besiyeri buzdolabında 2 aya kadar depolanabilir. 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 15 ml/tüp olacak şekilde 1234 tüp hazırlanabilir. Bu besiyeri ile ilgili olarak daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

#### **04.03. MR-VP Broth (Merck 1.05712)**

Dehidre besiyeri 17 g/l olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir ve standart deney tüplerine 5' er ml olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121 °C' da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renklidir. Hazırlanmış besiyeri buzdolabında 2 aya kadar depolanabilir. 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 5 ml/tüp olacak şekilde 5882 tüp hazırlanabilir. VP testi için kullanılan 50 g  $\alpha$ - naftol (Merck 1.06223) kutusu ile 1666 test, 500 g olan potasyum hidroksit (Merck 1.05033) kutusu ile 6250 test yapılabilir.

#### **04.04. Nitrate Broth (Merck 1.10204)**

Dehidre besiyeri 16,5 g/l olacak şekilde gerekirse ısıtılarak distile su içinde çözülür, tüplere 5' er ml dağıtılıp otoklavda 121 °C' da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renklidir. Hazırlanmış besiyeri buzdolabında 2 aya kadar depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 6060 test yapılabilir. Nitrat testi için kullanılan Griess-Ilosvay's nitrit çözültisinin (Merck 1.09023) 500 ml olan 1 şişesi ile ortalama 1750 test, çinko tozunun (Merck 1.08774) 100 g olan 1 kutusu ile 1000 test yapılabilir.