مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهارم، شماره سوم و چهارم (پیاپی ۱۱)، زمستان ۱۳۹۰
صفحات ۱۰۰-۹۳

Original Article

بررسی اثر فاکتورهای فیزیکوشیمیایی بر میزان تشکیل دی‌پیکولینیک اسید در *باسیلوس سرئوس* PTCC1015

صابر نیک سیرت*[۱]، محمد فائزی قاسمی[۲]، خسرو عیسی زاده[۲]، محمد رضا مجید خوش خلق پهلویانی[۳]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، [۲]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، [۳]مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان ،دانشکده علوم پایه،گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: دی‌پیکولینیک اسید (پیریدین ۲،٦- دی کربوکسیلیک اسید) یکی از مهم‌ترین ترکیبات اسپور باکتری‌ها می‌باشد. این ترکیب دارای ساختمان منحصر به فردی است و تنها در اندوسپور باکتری‌ها وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تنش های محیطی بر میزان تولید DPA در *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش به صورت تجربی اثر تنش های گرما، اتانول، نمک و pH بر اسپورزایی *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 با روش رنگ‌سنجی (تشکیل ترکیب رنگی حاصل از واکنش آهن با دی‌پیکولینیک اسید) و مقایسه آن با منحنی استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که افزایش میزان نمک و اسیدیته محیط موجب کاهش تشکیل DPA در سویه *باسیلوس سرئوس* می‌شوند. اما pH قلیایی در محدوده ی ۱۰-۸ افزایش آن را به دنبال دارد. همچنین در محدوده ۵ تا ۵۵ درصد اتانول کاهش چشمگیری در تولید DPA مشاهده گردید. در دمای بهینه ۳۰ ^{o}C میزان تشکیل DPA نسبت به شاهد بیشتر بود. همچنین با افزایش دما تا ۹۰ ^{o}C به دلیل عدم رشد باکتری تعداد سلول‌ها کاهش و به دنبال آن میزان DPA کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: محیط‌های استرسی که کم‌ترین تولید DPA را دارند می‌توانند در راستای کنترل اسپور *باسیلوس سرئوس* در صنایع غذایی و لبنی حائز اهمیت باشند.

واژگان کلیدی: DPA، رنگ سنجی، اسپور، *باسیلوس سرئوس*

دریافت مقاله: **مرداد ۱۳۹۰** *پذیرش برای چاپ:* **آبان ۱۳۹۰**

*)آدرس برای مکاتبه: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، صندوق پستی ۱٦۱٦
پست الکترونیک: Niksirat_saber@yahoo.com

مقدمه

به طور طبیعی بیش از ۱۰ درصد وزن خشک اسپورهای گونه‌های *باسیلوس* و *کلاستریدیوم* از پیریدین ۲،٦- دی کربوکسیلیک اسید (دی پیکولینیک اسید) (DPA) تشکیل شده است (۱ و ۲). این ترکیب در آخرین مرحله ساخت اسپور، در سلول مادری تولید می‌شود. اما تنها در پیش اسپور (forspore) در حال رشد ذخیره می‌گردد. DPA در طول فاز تاخیری اسپورسازی توسط یک قسمت از مسیر بیوسنتز لیزین ساخته می‌شود (۳). یک مرحله در این مسیر توسط دی هیدرو دی‌پیکولینات سنتتاز (DHDPA سنتتاز) کاتالیز می‌گردد. این آنزیم توسط ژن *dapA* کد می‌شود. بنابراین تخریب این ژن موجب تولید اسپورهای ناقص از نظر DPA می‌شود. بیشترین میزان DPA اسپور در هسته آن وجود دارد که با کاتیون‌های دوظرفیتی کلات شده است (٤ و ٥). این کاتیون‌ها عمدتاً شامل Ca^{2+}، مقدار قابل توجهی Mg^{2+} و نیز مقدار کمی Mn^{2+} دوظرفیتی می‌باشند (۸-٦). اولین بار در سال ۱۸۷٦ محققی به نام فردیناند کوهن (Ferdinand Cohn)، جزئیات اسپور را شرح داد. پس از آن دانشمندان مختلفی از جمله اهرنبرگ (Ehrenberg) در اوایل قرن ۱۹ به طور مستقیم و غیرمستقیم اسپور را توصیف نمودند (۱۱-۹). کوهن مشاهده نمود که بیشتر ساختمان اسپور از کمپلکس CA –DPA تشکیل شده است و پس از پروتئین پپتیدوگلیکان، کراتین و اسید آمینه سیستئین، بزرگ‌ترین بخش تشکیل دهنده اسپور در *باسیلوس مگاتریوم* (*B. megaterium*) می‌باشد (۱۲).

حضور دی‌پیکولینیک اسید در اسپور باکتری برای اولین بار در سال ۱۹۵۳ به وسیله پاول (Pavel) در باکتری *باسیلوس مگاتریوم* گزارش گردید (۱۳).

از آن‌جایی که بیشتر میکروارگانیسم‌ها دوره زیادی از حیات خود را در مقابل تنش‌های محیطی می‌گذرانند، اطلاعات و یافته‌های بیشتری در مورد استرس و پاسخ در برابر آن برای دانستن کامل فیزیولوژی میکروب‌ها ضروری می‌باشد (١٦-١٤). از این رو مطالعه پاسخ‌های استرس به عنوان یک موضوع مهم بیولوژیکی به وسیله محققان زیادی از جمله یانگ کینگ لی (Yong-qing Li) مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷ و ۱۸). هدف از این پژوهش، بررسی اثر تنش‌های محیطی (گرما، اتانل، نمک و pH) بر میزان تولید دی‌پیکولینیک اسید در *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 بود.

مواد و روش‌ها

سویه *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری‌های عفونی ایران تهیه گردید. ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه مانند آسکوربیک اسید، فروس سولفات آمونیوم و دیگر محلول‌ها و محیط‌های کشت مصرفی شامل: NB (Nutrient broth)، TSA (Tripticase Soy Agar)، NA (Nutrient Agar)، BHI (Brain Heart Infosion Agar) همگی از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

در این مطالعه ابتدا سویه میکروبی لیوفیلیزه *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 در محیط‌های TSB، BHI و NA کشت اولیه داده و کلنی تک از آن‌ها جداسازی گردید. محیط کشت نوترینت براث (NB) به عنوان محیط کشت پایه انتخاب و تحت تاثیر استرس‌های مختلف قرارگرفت.

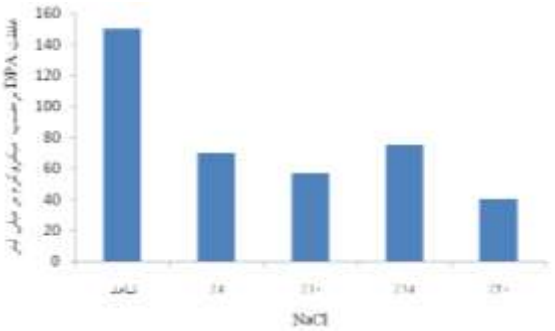
از آن‌جایی که باکتری‌های اسپور دار در شرایط سخت محیطی اقدام به اسپورزایی و آزاد کردن DPA می‌نمایند، در این پژوهش از تنش‌های فیزیکوشیمیایی (اتانل، نمک، گرما و pH) استفاده گردید.

برای رسم منحنی رشد باکتری‌ها از کشت ٤٨ ساعته باکتری *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 در دمای ۳۵ °C در انکوباتور شیکردار استفاده گردید. ابتدا محیط کشت اولیه بدون تلقیح، در طول موج ٦٠٠ nm تنظیم و میزان کدورت محیط‌ها در فاصله‌های زمانی ۲ ساعته از زمان تلقیح اندازه‌گیری گردید.

داده‌های منحنی استاندارد توسط اسپکترفتومتر (Backman DU) بدست آمد و چگالی نوری در nm ٤٤٠ اندازه گیری شد. در این مطالعه از روش رنگ سنجی (تشکیل ترکیب رنگی حاصل از واکنش آهن با دی‌پیکولینیک اسید) استفاده گردید (۱۹).

به منظور آزمایش رنگ سنجی دی‌پیکولینیک اسید موجود در اسپورها از کشت یک شبه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 در محیط پایه نوترینت براث استفاده شد. ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور *باسیلوس‌ها* حاوی ٤ تا ۲۰ میلی گرم اسپور (وزن خشک) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C استریل شد. سپس سوسپانسیون به کمک ۰/۱ میلی لیتر اسید استیک یک نرمال اسیدی گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. برای به دست آوردن مایع رویی شفاف، محلول را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید تا مواد نامحلول ته نشین شوند.

٤ میلی لیتر از مایع رویی به لوله‌ای تمیز انتقال داده شد و یک میلی لیتر معرف تازه محلول (حاوی یک درصد فرو آمونیوم سولفات و یک درصد آسکوربیک اسید در ۰/۵ مولار بافر استات با pH ۵/۵) به آن اضافه گردید. در نهایت جذب نوری در طول موج ٤٤٠ نانومتر اندازه گیری و میزان DPA به کمک منحنی استاندارد محاسبه شد.



شکل ۱: میزان تشکیل DPA توسط *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 در غلظت‌های مختلف نمک.

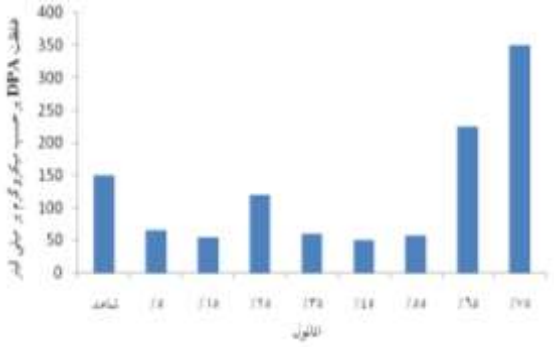
نتایج

در شرایط استرسی غلظت‌های مختلف نمک، غلظت ۲۰ درصد کمترین میزان تولید DPA در *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 را نشان داد. در صورتی که افزایش نسبی تولید DPA در غلظت ۱۵ درصد نسبت به ۵ درصد مشاهده گردید (شکل ۱).

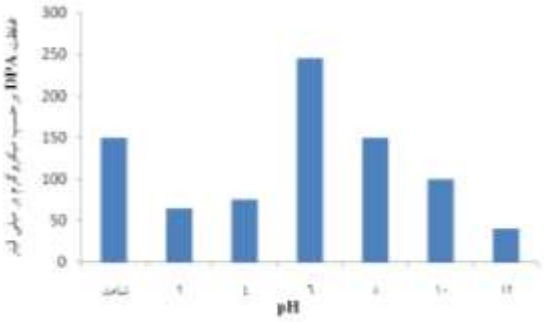
در بررسی انجام شده در حجم‌های ۵ تا ۷۵ درصد اتانول، میزان تشکیل DPA در ۷۵ و سپس ٦٥ درصد قابل توجه بود. تشکیل DPA در حجم‌های ۵ تا ۵۵ درصد تا حدودی یکسان بود. اگر چه در ۲۵ درصد افزایش جزئی مشاهده گردید (شکل ۲).

ارزیابی تغییرات pH در سویه مورد بررسی نشان داد که در pH ٦ افزایش DPA چشمگیر بوده است، به طوری که در محیط اسیدی تولید DPA تا pH خنثی افزایش صعودی را نشان داد. اما در محیط قلیایی از pH ٦ تا ۱۲ روال نزولی تولید DPA مشاهده شد (شکل ۳).

بررسی دامنه‌های مختلف حرارتی در *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 نشان داد که بیشترین میزان تولید DPA مربوط به دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. از طرفی در دامنه حرارتی ٤٠ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد میزان تشکیل



شکل ۲: میزان تشکیل DPA توسط *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 در غلظت‌های مختلف اتانول.



شکل ۳: میزان تشکیل DPA توسط *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 در دامنه‌های مختلف pH.

DPA کم و بیش یکسان بود. اما در محدوده ۹۰ درجه سانتی‌گراد افزایش چشمگیری نسبت به بقیه دماها مشاهده گردید (شکل ٤).

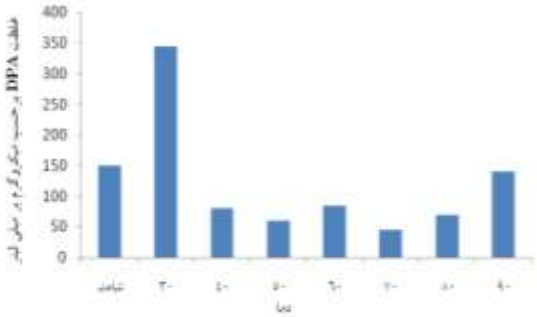
بحث

در این پژوهش اثر تنش‌های مختلف (حرارت، فشار اسمزی، اتانول و pH) بر میزان تشکیل DPA در *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 مورد بررسی قرار گرفت. هر یک از تنش‌ها اثر متفاوتی در تشکیل DPA داشتند. یانگ کینگ لی (Yong-qing Li) و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش طیف سنجی، همزمان با جوانه‌زن اسپور سویه‌هایی از *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس مگاتریوم* را در معرض پرتوهای لیزر در حرارت ۳۷°C قرار دادند. آن‌ها مشاهده نمودند که میزان تشکیل Ca- DPA در باند ۱۰۱۷ Cm^{-1} بیشترین مقدار را داشته است (۲۰ و ۲۱).

رامانا و همکاران در مطالعه خود گزارش نمودند که آنالیز Ca- DPA در جوانه‌زنی *باسیلوس سوبتیلیس* با دودسیل آمین به دلیل تعامل با غشای درونی اسپور موجب ایجاد کانال‌هایی برای خروج Ca- DPA می‌شود. همچنین در بررسی آن‌ها بیشترین مقدار آزاد سازی Ca- DPA در pH ۹ و دمای اپتیمم ٦٠°C بوده است و درگیر بودن پروتئین‌های اپرون *spoVA* در فرآیند اسپورزایی بی‌تاثیر نبوده است. ویپاچیدو(Vepachedu) و همکاران نیز در گزارش خود به تأثیر این پروتئین بر تولید DPA اشاره نمودند (۲۲).

همانطور که در شکل یک نشان داده شده کاهش تولید DPA در غلظت ۲۰ درصد نمک مشاهده گردید. در محدوده غلظت ۵ تا ۲۰ درصد سیر نزولی تولید DPA مشاهده می‌شود. فشار اسمزی هایپرتونیک، موجب کاهش آب سیتوپلاسم، چروکیده شدن و پلاسمولیز سلول می‌گردد. اختلال در آنزیم‌ها و پروتئین‌های رونویسی موجب مرگ سلولی می‌شود و سرانجام این فرآیند کاهش تولید DPA را در پی خواهد داشت.

با توجه به داده‌های شکل ۲ مشاهده می‌شود که میزان



شکل ٤: میزان تشکیل DPA *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 در دماهای مختلف.

تولید DPA در غلظت‌های ۵ تا ۵۵٪ اتانول تقریباً یکسان بوده است. اما در غلظت ٦٥٪ و ٧٥٪ ناگهان میزان تولید DPA افزایش می‌یابد. اگر چه غلظت بالای اتانول برای بیشتر میکروب‌ها کشنده است، اما در این پژوهش در غلظت‌های ٦٥ و ٧٥ درصد افزایش تولید DPA مشاهده شد. بنابراین می‌توان چنین استنباط نمود که باکتری‌های اسپوردار بر خلاف محیط‌های اسیدی که موجب لیز سلولی می‌شوند، در غلظت بالای اتانلی سیستم حفاظتی‌شان تقویت می‌شود و برای حفظ بقا، تعداد ژن‌های رونویسی، فاکتورهای سیگما و پروتئین (FtsZ) افزایش می‌یابد.

در این مطالعه با توجه به مزوفیل بودن باکتری *باسیلوس سرئوس*، بیشترین میزان تولید DPA را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید (شکل ٤). این یافته با نتایج به دست آمده در پژوهش یانگ کینگ لی(Yong-qing Li) و همکاران هم‌خوانی دارد (۲۰ و ۲۱). از طرفی در محدوده ۸۰ –۵۰ درجه سانتی‌گراد، در مقایسه با DPA استاندارد، کاهش میزان تولید DPA آشکار است. در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد ماکرومولکول‌های موثر در تولید آندوسپور افزایش می‌یابند. از طرفی ژن تقسیم سلولی *ftsZ*، ژن‌های اسپورزایی از جمله *dgKA* و نیز انواع آنزیم‌های افزایش سطح کورتکس پیش اسپور ازدیاد پیدا می‌کنند و در نهایت موجبات رشد سلولی را فراهم می‌آورند.

با توجه به داده‌های شکل ۳، مشاهده می‌شود که در pH اسیدی و قلیایی میزان DPA تولید شده کمتر می‌باشد. دلیل این امر به ویژه در محیط اسیدی را می‌توان به غیرفعال شدن گیرنده ماده جوانه‌زن در غشای سلول نسبت داد. از طرفی با کم شدن تعداد سلول در محیط اسیدی فرایند تقسیم سلولی نیز مختل می‌گردد. اما در محدوده pH ۱۰–٦ افزایش چشمگیری در تولید DPA مشاهده می‌شود. pH بهینه برای تولید DPA در این پژوهش در محدوده ۸– ٦ بود که با نتایج به دست آمده در مطالعه ویپاچیدو(Vepachedu) و همکاران مطابقت دارد (۲۲).

به طور کلی فاکتورهای استرسی اثرات زیادی بر روی اعمال فیزیولوژی و تمایز سلولی در *باسیلوس سرئوس* PTCC1015 داشتند. اگر این باکتری‌ها در محیط‌های تنش‌زای غیرکشنده قرار گیرند، قادر خواهند بود بخش عمده‌ای از ژن‌ها و پروتئین‌های اسپورزایی را فعال نمایند.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که در محیط‌های استرسی با pH ۲ تا ٤ و ۱۰ تا ۱۲، دمای ٤٠ تا ۸۰ درجه سانتی گراد، فشار اسمزی بالای ۲۰٪ و اتانل با غلظت کمتر از ٦٥٪، میزان تشکیل DPA باکتری در مقایسه با DPA شاهد کم‌ترین میزان را دارد. بنابراین این مساله می‌تواند در راستای کنترل اسپور *باسیلوس سرئوس* در صنایع غذایی و لبنی حائز اهمیت باشد. درک جامع از فاکتورهای استرسی نه تنها برای فیزیولوژی باکتری‌ها بلکه به منظور مقایسه ژنومی، آنالیز پروتومیکس (نقشه پروتئینی)، سم شناسی مولکولی، بیماری‌زایی و نیز کنترل عامل بیماری‌زا مهم و ضروری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از زحمات ارزنده خانم اندیش کارشناس مسئول آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان کمال امتنان را دارند.

References

1. Wijnands L, Dufrenne J, Zwietering M, Leusden F. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and growfaster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. Int J Food Microbiol. 2006; 112(2) : 120-128.

2. Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. J Bacteriol. 2005; 187(11): 3800-3806.

3. Setlow P, Hurs A, Gould WJ. Studies of the commitment step in the germination of spores of *bacillus* species. J Bacteriol. 2010;192(13): 3424-3433.

4. McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. Net Rev Microbiol. 2013;11(1): 33-44.

5. Fichtel J, Köster J, Rullkötter J, Sass H. Spore dipicolinic acid contents used for estimating the number of endospores in sediments. FEMS Microbiol Ecol. 2007; 61(3): 522-532.

6. Ponce A,Yang WW. Rapid endospore viability assay of *Clostridium sporogenes* spores. Int J Food Microbiol. 2009; 133(3): 213-216.

7. MarlesWJ, Lewis RJ. Stress responses of bacteria. Science Direct. 2007;17(6): 755-670.

8. Coleman WH, Chen D, Li YQ, Cowan AE, Setlow P. How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis.* J Bacteriol. 2007;189(23): 8458-8466.

9. Young SB, Setlow P. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. J Appl Microbiol. 2004; 96(5): 1133- 1142.

10. Domigan LJ, Scally SW, Fogg MJ, Hutton CA, Perugini MA, Dobson RCJ, Muscroft-Taylor AC, Gerrard JA, Devenish SRA. Characterisation of dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) from *Bacillus anthracis*. Biochim Biophys Acta. 2009; 1794(10): 1510-1516.

11. Magge A,Granger AC,Wahome PG. Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2008; 190(14): 4798-4807.

12. Devenish SR, Gerrard JA, Jameson GB, Dobson RC. The high-resolution structure of dihydrodipicolnate synthase from *Escherichia coli* bound to its first substrate, pyruvate. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2008; 64(12): 1092-1095.

13. Orsburn B, MelvilleSB, Popham DL. EtfA catalyes the formation of dipicolinic acid in *Costridum perfrigens*. Mol Microbiol. 2010; 75(1): 178-186.

14. Sonenshein AL. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis.* Curr Opin Microbiol. 2000; 3(6): 561-566.

15. Cohn F. Untersuchungen ueber Bakterien. In: Thomas D, Brock AS, (eds.). Beitraegezur Biologie der Planzen. ASM Press. p.210. 2007.

16. EhrenbergCG. Physikalische Abhandlungen der Koenig lichen Academia der Wissenschaftenzu Berlin aus den Jahren 1833–1835. 1835. pp. 145–336.

17. Michael P. Microbial steressrespones. In: Albert G.Moat, John W.foster, (eds). Microbial physiology. Wiley-Liss. 582-597. 2002.

18. Russell AD. Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. Sci Prog. 2003; 86(1-2): 115-137.

19. Kong L, Setlow P, Li YQ. Analysis of the Raman spectra of Ca2+-dipicolinic acid alone and in the bacterial spore core in both aqueous and dehydrated environments. Analyst. 2012; 137(16): 3683-3689.

20. Li YQ, Setlow P. Levels of Ca2+-dipicolinic acid in individual *Bacillus* spores determined using microfluidic Raman tweezers. J Bacteriol. 2007; 189(13): 4681-4687.

21. Vepachedu VR, Setlow P. Studies of the release of small molecules during pressure germination of spores of *Bacillus subtilis*. J Appl Microbiol. 2007; 45(3): 342-8.

22. Vepachedu VR, Setlow P. Role of SpoVA proteins in *Bacillus subtilis* sporestriggered by dodecylamine or lysozyme. J Bacteriol. 2007; 189(5): 1565-1572.

Journal Of Microbial World
Vol 4, No 3 & 4, January 2012

Original Article

Study of physicochemical factors on dipicolinic acid formation by *Bacillus cereus* PTCC1015

Saber Niksirat[1], Mohammad Faezi Ghasemi[2], Khosro Isasazadh[2], Mohammad Reza Khosh Kholgh Pahlaviani[3]

[1]M.Sc. Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
[3]Lecturer. Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

Abstract

Background and Objective: Dipicolinic acid (pyridne 2, 6 dicarboxylic acid) is a major component of bacterial spore and is unique in that it has been found only in bacterial endospore. This study was aim to evaluate the environmental stress on DPA production in *Bacillus cereus* PTCC1015.

Materials and Methods: In this experimental study the effects of environmental stresses including temperature, ethanol, NaCl and pH on the production of DPA by *Bacillus cereus* PTCC 1015 were evaluated by colorimetric assay (the color complex formed by interaction of ferrous iron with dipicolinic acid) and comparison with standard curves.

Results: The results showed that the amount of DPA in *B. cereus* decreased upon increase in acidic condition and salt concentration in the medium. DPA formation increased at alkaline pH 8-10. DPA formation decreased in the medium containing 5-55% of ethanol. DPA formation was higher in optimum temperature at 30 ºC in comparison to the reference strains. The cell concentration decreased at 90 ºC and level of DPA detected in this stage.

Conclusion: In stressful condition, DPA formation significantly reduced and these properties can be used in food and dairy industries to control spore production of *Bacillus cereus*.

Keyword: DPA, Colorimetric, Spore, *Bacillus cereus*

Correspondence to: Saber Niksirat
E-mail: Niksirat_saber@yahoo.com
Journal of Microbial World, 2012, 4 (3&4): 93-100.