

ARTIKEL PENELITIAN

VIABILITAS *BACILLUS SUBTILIS* DI MEDIA PRESERVASI
AGAR SUSU SKIM PADA TIGA VARIAN SUHU PENYIMPANAN

VIABILITY OF *BACILLUS SUBTILIS* PRESERVED IN SKIM MILK AGAR
AT THREE DIFFERENT STORAGE TEMPERATURES

Sheila Febrilia¹, Enty^{2,*}

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Pluit Raya No. 2, Jakarta, 14440

² Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Pluit Raya No. 2, Jakarta, 14440

* **Korespondensi:** enty@atmajaya.ac.id

ABSTRACT

Introduction: Bacterial preservation is a common practice in microbiology laboratories. Several methods considered ideal for long-term bacterial preservation are freeze-drying and cryopreservation. Skim milk agar has been used for specific preservation media. *Bacillus* sp, like *Bacillus subtilis*, is easy to grow on many growth media. This study aims to determine the viability of *Bacillus subtilis* preserved in skim milk agar and stored at 3 different temperatures for 150 and 270 days.

Methods: *B.subtilis* ATCC 6633 isolates cultivated in skim milk agars were divided into 3 groups based on temperatures. The viability assessment was carried out twice on days 150 and 270. Colony count has been carried out with Miles & Misra method. Bacterial growth will be recorded and analysed using general linear model in SPSS.

Results: *B.subtilis* ATCC 6633 preserved in skim milk agar for 150 and 270 days were viable. Statistically, skim milk agar and storage temperature showed no significant effect on the growth of *B.subtilis* ATCC 6633 ($p>0,005$).

Conclusion: There is no significant effect of preservation media and storage temperature on the growth of *B.subtilis* ATCC 6633.

Key Words: bacteria viability, *B.subtilis* ATCC 6633, skim milk agar.

ABSTRAK

Pendahuluan: Preservasi bakteri merupakan hal yang umum pada kebanyakan laboratorium mikrobiologi. Berbagai metode seperti kering beku dan penyimpanan suhu rendah dianggap sebagai metode preservasi yang ideal, tetapi metode ini membutuhkan alat dan operator khusus. Agar Susu Skim merupakan media yang umum digunakan untuk preservasi bakteri. *B.subtilis* merupakan bakteri yang mudah tumbuh pada kebanyakan media. Studi ini bertujuan untuk mengidentifikasi viabilitas *B.subtilis* ATCC 6633 yang disimpan pada 3 suhu berbeda selama 150 dan 270 hari.

Metode: Isolat *B.subtilis* ATCC 6633 dikultivasi ke dalam tabung berisi agar susu skim, yang kemudian akan dibagi menjadi 3 kelompok penyimpanan berdasarkan suhu yang telah ditentukan. Uji viabilitas akan dilakukan sebanyak 2 kali pada hari ke-150 dan 270 dengan menggunakan metode Miles & Misra. Hasil uji akan dicatat dan dianalisa dengan menggunakan uji *General Linear Model* pada aplikasi SPSS.

Hasil: Viabilitas bakteri *B.subtilis* ATCC 6633 pada hari ke-150 dan 270 menunjukkan hasil yang sama yaitu bakteri tetap viabel. Secara statistik, tidak ada pengaruh yang bermakna oleh media preservasi dan suhu penyimpanan terhadap pertumbuhan bakteri *B.subtilis* ($p>0,005$).

Simpulan: Tidak ada pengaruh yang bermakna antara media preservasi dan suhu penyimpanan terhadap pertumbuhan bakteri *B.subtilis* ATCC 6633.

Kata Kunci: viabilitas bakteri, *B.subtilis* ATCC 6633, agar susu skim.

PENDAHULUAN

Preservasi bakteri merupakan hal penting pada kebanyakan laboratorium pendidikan,

an, pelayanan, dan penelitian. Preservasi bakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti kering beku (*freeze dry* dan *spray dry*),

Culti-Loops®, kriopreservasi pada suhu rendah (-150°C), penggunaan gliserol/paraffin pada suhu rendah (-80°C) dan media preservasi tertentu. Metode *freeze dry*, *spray dry*, dan kriopreservasi (*freezing and frozen storage*) merupakan metode yang ideal digunakan dalam preservasi bakteri jangka panjang. Kekurangan dari metode ini adalah membutuhkan alat khusus yang harus dioperasikan oleh operator dengan keahlian khusus yang pada umumnya tidak tersedia pada kebanyakan laboratorium, selain itu energi yang dibutuhkan pada metode ini juga tidak sedikit serta proses pengerjaan yang kompleks.¹

Metode *Culti-Loops*® umumnya dihasilkan oleh pabrikan untuk tujuan komersil dan banyak digunakan untuk tujuan kendali mutu (*quality control*). Bakteri yang disimpan dalam bentuk *Culti-Loops* banyak diminati karena ketahanannya pada suhu ruang atau 4°C dan dapat langsung digunakan.²

Metode preservasi dengan menggunakan minyak mineral yang banyak dilakukan pada bakteri dan fungi dapat dijadikan salah satu alternatif dalam preservasi dalam jangka waktu 3 tahun. Aktivitas metabolik bakteri masih tetap aktif dengan metode ini, sehingga mutasi pada bakteri masih dapat terjadi. Minyak mineral yang digunakan adalah minyak dengan nilai grafitas spesifik (0,865 – 0,890). Bakteri perlu ditanam dan diidentifikasi pertumbuhannya terlebih dahulu serta dilanjutkan dengan penambahan minyak mineral setinggi 1-2 cm.

Preservasi bakteri juga dapat dilakukan dengan menyimpan bakteri pada suhu *freezer* -20°C. Dengan metode ini, bakteri dapat ber-

tahan selama 1-2 tahun tergantung dari spesies yang digunakan. Kekurangan dari metode ini adalah pembentukan kristal es selama masa penyimpanan yang dapat merusak dinding sel bakteri sehingga kurang tepat jika dijadikan sebagai metode preservasi jangka panjang.

Preservasi bakteri jangka pendek pada umumnya dilakukan di setiap laboratorium mikrobiologi untuk penggunaan sehari-hari. Metode ini dilakukan dengan menumbuhkan bakteri di media agar baru dan disimpan pada suhu 4°C. Risiko kontaminasi dan kemungkinan agar mengering tidak dapat dicegah, tetapi dapat diminimalisir dengan penggunaan *laboratory film*, penyimpanan dalam keadaan terbalik dan penyimpanan bakteri pada suhu rendah (5-8°C) akan membantu memperlambat proses metabolik bakteri sehingga dapat memperpanjang waktu penyimpanan.³

Enriched media merupakan contoh media pertumbuhan yang banyak digunakan dan terdapat nutrisi tambahan. Nutrisi tambahan dapat berupa darah, serum, kuning telur. Beberapa contoh *enriched media* adalah agar darah (*trypticase soy agar* yang ditambahkan darah domba 5%), *chocolate agar* (agar darah yang dipanaskan), dan *Loeffler's serum slope*.

Beberapa media perbenihan padat tanpa nutrisi tambahan banyak dimanfaatkan sebagai media preservasi. Beberapa contoh media perbenihan padat yang sering digunakan adalah *MacConkey Agar* yaitu media yang memiliki komponen seperti garam empedu dan violet kristal yang memungkinkan pertumbuhan bakteri gram negatif dan menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Agar susu

skim adalah media yang banyak digunakan untuk biakan dan enumerasi pada produk berbahan dasar susu yang direkomendasikan oleh *American Public Health Association* (APHA). Komposisi dari skim milk adalah tripton sebagai sumber asam amino, ekstrak ragi, dekstrosa, dan bubuk *skim milk* sehingga media ini dianggap sebagai media yang kaya akan nutrisi.

Sebuah media preservasi yang baik harus memiliki nutrisi yang cukup untuk mendukung kelangsungan hidup bakteri, menurunkan proses metabolik bakteri dan menurunkan laju pertumbuhannya. Media preservasi yang optimal belum dapat didefinisikan secara mutlak dan bervariasi tergantung spesies bakteri yang digunakan.

Sebelum menjalankan proses preservasi, penting bagi laboratorium untuk mengidentifikasi ketersediaan sumber daya manusia, alat dan bahan, tujuan preservasi, dan daya tumbuh bakteri sebelum melakukan preservasi. Mengidentifikasi tujuan preservasi akan membantu dalam menentukan metode preservasi yang akan digunakan. Contoh jika preservasi bertujuan untuk penyimpanan jangka panjang maka dibutuhkan mesin pendingin (*ultralow freezer* atau *liquid nitrogen*), serta diperlukan mesin untuk melakukan proses *freeze dry* atau *spray dry*. Jika tujuan preservasi adalah periode waktu jangka pendek, maka penggunaan media perbenihan padat merupakan salah satu metode yang dapat digunakan.

Pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh banyak hal selain media pertumbuhan yaitu suhu pertumbuhan, nutrisi yang

dibutuhkan seperti sumber karbon atau mineral (sulfur, fosfor, atau potasium), dan pH.⁴ Tidak semua bakteri dapat tumbuh dengan baik dalam media, suhu, nutrisi dan pH yang sama. Hal ini dikarenakan bakteri memiliki karakteristik pertumbuhan optimum yang bervariasi agar dapat tumbuh dengan baik.

Penelitian Sadhu mendapatkan bahwa pertumbuhan bakteri paling optimal adalah pada suhu 15°C - 30°C, sedangkan penyimpanan bakteri pada suhu di bawah 7°C akan menyebabkan pertumbuhan yang melambat.⁵ Selain itu, penelitian Wiebe mendapatkan bahwa setiap penurunan suhu akan menyebabkan peningkatan kebutuhan substrat yang memengaruhi pertumbuhan.⁶

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif, saprofit, motil karena memiliki flagella, dan dapat ditemukan dengan mudah di tanah, udara, dan susu murni. Bakteri ini juga merupakan mikroorganisme yang dapat membentuk spora dan bakteri non-patogen tetapi memiliki kemampuan untuk mengontaminasi makanan dan dianggap sebagai patogen oportunistik.⁷ *B. subtilis* dapat melakukan sporulasi bila berada pada kondisi yang tidak menguntungkan. Peran dari sporulasi adalah untuk menghasilkan sel dorman yang secara metabolisme tidak aktif yang dikenal dengan sebutan endospora yang memungkinkan untuk mampu bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang buruk karena memiliki ketahanan pada panas, pengeringan, radiasi, pembekuan, dan disinfeksi.⁸ *B. subtilis* memiliki bentuk koloni yang bulat, memiliki permukaan yang kasar, opak, berwarna putih

atau putih kekuningan dengan tepi yang bergerigi.⁹

Penggunaan media perbenihan padat merupakan kegiatan yang umum dilakukan pada laboratorium mikrobiologi baik dalam bidang penelitian maupun akademis. Kegunaan agar pada umumnya adalah sebagai media transfer sampel atau isolat bakteri. Agar lebih baik disimpan pada suhu ruang maupun suhu kulkas untuk menghindari rusaknya agar, hal ini diakibatkan karena komposisi agar yang kurang tepat jika disimpan pada suhu *freezer* karena kristal es yang terbentuk dapat merusak agar maupun isolat yang ditanam.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari terkait metode preservasi pada media pertumbuhan yang umum tersedia pada kebanyakan laboratorium seperti agar susu skim yang disimpan pada suhu -20°C, 2-8°C, dan suhu ruang (15-25°C).

METODE

Desain penelitian adalah deskriptif analitik yang dilakukan pada bulan Agustus 2020 hingga Mei 2021 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Unika Atma Jaya Jakarta. Total sampel sebanyak 27 tabung.

Variabel dependen pada penelitian ini adalah viabilitas bakteri yang diuji dengan menggunakan metode Miles & Misra dan jum-

lah bakteri (CFU/ml). Variabel independen pada penelitian ini adalah media penyimpanan yaitu agar susu skim dan suhu penyimpanan bakteri (-20°C, 2-8 °C, dan suhu ruang (15-25 °C)).

Analisis data dilakukan secara multivariat dengan menggunakan SPSS versi 22.0. Analisis multivariat dilakukan menggunakan *general linear model*.

HASIL

Bakteri yang telah ditanam pada agar susu skim disimpan pada suhu -20°C, 2-8°C, dan suhu ruang (15-25°C) selama 150 hari. Bakteri akan diambil pada hari ke-150 dan ke-270 untuk dilanjutkan dengan pengamatan viabilitas pada kedua media uji. Viabilitas bakteri dinilai berdasarkan ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan agar setelah proses pembiakan ulang (subkultur) sesuai dengan prosedur mikrobiologi yang standar pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam.

Hasil viabilitas seluruh kelompok coba menunjukkan 100% viabel (9 dari 9 tabung bakteri dengan kondisi yang diujikan) mengalami pertumbuhan yang ditandai dengan kekeruhan (Tabel 1). Uji enumerasi dilakukan pada salah satu di antara 9 tabung kelompok uji untuk mendapatkan perhitungan konsentrasi/ jumlah bakteri dengan satuan CFU/mL (*Colony Forming Unit*) (Tabel 2).

Tabel 1. Persentase Viabilitas *B.subtilis* ATCC 6633 pada Hari ke-150 dan 270

No. Tabung	Media Preservasi	Suhu Penyimpanan	Hasil Pengamatan Pertumbuhan		Persentase Viabilitas
			150 hari	270 hari	
1-9	Agar susu skim	-20 °C	Tumbuh	Tumbuh	100%
1-9		2-8 °C	Tumbuh	Tumbuh	100%
1-9		Suhu ruang (15-25°C)	Tumbuh	Tumbuh	100%

Secara umum, bakteri *B.subtilis* ATCC 6633 masih dapat ditumbuhkan kembali dengan setelah penyimpanan 270 hari di 3 suhu yang berbeda. Jumlah bakteri tertinggi (1.125×10^4 CFU/mL) bakteri *B.subtilis* ATCC 6633

tampak pada penyimpanan pada suhu ruang ($15-25^\circ\text{C}$). Jumlah bakteri terendah (4×10^2) bakteri *B.subtilis* ATCC 6633 tampak pada penyimpanan di suhu -20°C .

Tabel 2. Hasil Pengamatan Viabilitas dan Enumerasi Bakteri *B.subtilis* ATCC 6633 pada Agar Susu Skim Setelah Penyimpanan pada Suhu -20°C , $2-8^\circ\text{C}$, dan Suhu Ruang ($15-25^\circ\text{C}$) Selama 150 dan 270 Hari

Suhu	Faktor Dilusi	Penyimpanan 150 hari		Penyimpanan 270 hari	
		Pertumbuhan bakteri	Jumlah Bakteri (CFU/ml)	Pertumbuhan bakteri	Jumlah Bakteri (CFU/ml)
-20°C	10^0	Tumbuh	4×10^2	Tumbuh	1.75×10^3
	10^{-1}	Tidak Tumbuh		Tumbuh	
	10^{-2}	Tidak Tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-3}	Tidak Tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-4}	Tidak Tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-5}	Tidak Tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-6}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-7}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
$2-8^\circ\text{C}$	10^0	Tumbuh	3×10^3	Tumbuh	5×10^2
	10^{-1}	Tumbuh		Tumbuh	
	10^{-2}	Tidak Tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-3}	Tidak Tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-4}	Tidak Tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-5}	Tidak Tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-6}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-7}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
Suhu Ruang ($15-25^\circ\text{C}$)	10^0	Tumbuh	1.125×10^4	Tumbuh	5×10^3
	10^{-1}	Tumbuh		Tumbuh	
	10^{-2}	Tidak tumbuh		Tumbuh	
	10^{-3}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-4}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-5}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-6}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
	10^{-7}	Tidak tumbuh		Tidak Tumbuh	
10^{-8}	Tidak tumbuh	Tidak Tumbuh			

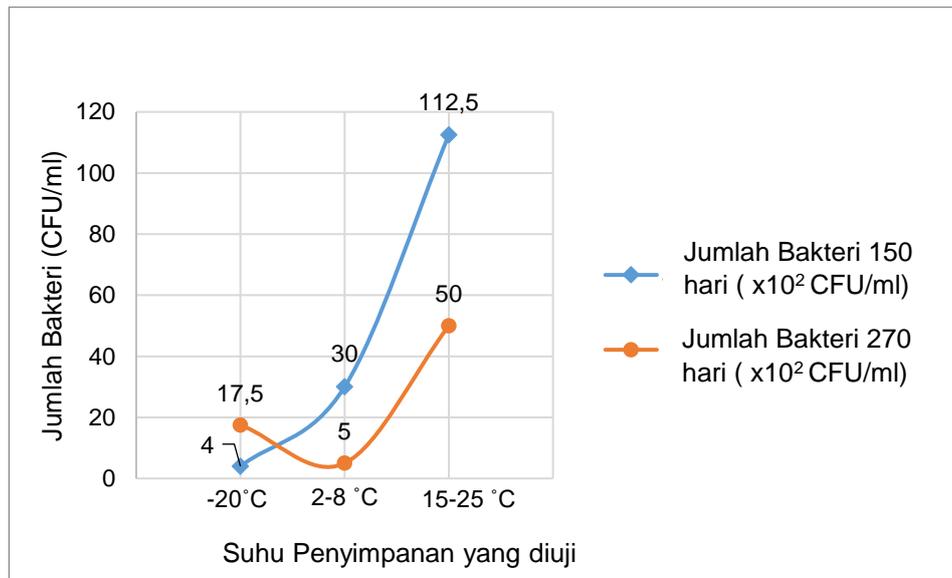
Hasil analisis data menggunakan uji statistik *general linear model* menunjukkan bahwa media perbenihan dan suhu penyimpanan tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan dan viabilitas bakteri ($p>0,05$) (Tabel 3).

DISKUSI

Perubahan ekstrim pada kondisi lingkungan akan menyebabkan bakteri mati, berhenti bertumbuh, atau berada dalam fase *lag* yang memanjang dan penurunan laju pertumbuhan. Psikrofil adalah bakteri yang dapat

tumbuh pada suhu 0°C serta memiliki suhu pertumbuhan optimal 15°C dan suhu pertumbuhan maksimal 20°C. Perubahan pada kondisi lingkungan pertumbuhan yang terlalu jauh dari kondisi idealnya akan menyebabkan *cold response* yang menyebabkan bakteri

akan mementingkan *survival* dibandingkan dengan pertumbuhan. Bakteri gram negatif dapat beradaptasi lebih baik dengan penurunan suhu lingkungan dibandingkan dengan bakteri gram positif.¹⁰



Gambar 1. Grafik Pertumbuhan *B.subtilis* ATCC 6633 pada Agar Susu Skim Selama 270 hari

Tabel 3. Hasil Analisa Data Menggunakan *General Linear Model*

Faktor yang Diteliti		Penyimpanan	
		150 hari	270 hari
Media	Agar susu skim	p > 0,05	
Suhu	-20 °C	p > 0,05	
	2-8 °C		
	Suhu Ruang (15-25°C)		

Suhu dapat memengaruhi respon bakteri secara langsung dengan memengaruhi laju pertumbuhannya, aktifitas enzim, komposisi sel, dan kebutuhan akan nutrisi atau secara tidak langsung dengan memengaruhi transpor ion, difusi, tegangan permukaan dan densitas. Sepanjang penurunan suhu, maka fase *lag* bakteri akan memanjang menyebabkan penurunan laju pertumbuhan¹⁰.

Suhu memengaruhi kurva pertumbuhan bakteri. Hal ini didapatkan pada penelitian yang menggunakan bakteri *S.marcescens*, *E.coli*, *B.subtilis*, *P.fluorescens*, *B.megaterium*, dan *P.aeruginosa* yang pertumbuhannya diamati dengan menggunakan kurva Arrhenius. Hasilnya menunjukkan bahwa suhu pertumbuhan optimum bakteri sekitar 38°C serta menyatakan bahwa akan terjadi penu-

runan pertumbuhan bakteri pada suhu yang rendah.¹¹

Penelitian lain oleh Jordan, *et al.* adalah dengan menyimpan bakteri pada suhu 15-40°C. Hasilnya adalah suhu 15°C merupakan kondisi yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri pada percobaannya. Selain itu suhu 35°C dan 40°C menyebabkan penurunan laju pertumbuhan bakteri. Suhu yang terlalu tinggi dianggap sebagai suhu kritis untuk viabilitas bakteri. Pernyataan ini dibuktikan dengan hasil penelitian yang menunjukkan jumlah bakteri yang viabel akan menurun dimulai pada suhu 30°C.¹²

Penelitian terkait efek media pertumbuhan, ukuran inokulum dan waktu inkubasi pada isolasi bakteri tanah yang dilakukan oleh Kathryn, *et al.* mendapatkan bahwa media berperan penting dalam pertumbuhan bakteri. Hal ini dibuktikan dengan hasil penelitian pada medium VL55 memiliki hasil pertumbuhan yang kurang baik dibandingkan dengan media lain yang digunakan.¹³ Penelitian lain oleh Ochoa, *et al.* membandingkan media dan kondisi pertumbuhan untuk melakukan biakan terhadap *Helicobacter* sp., menemukan bahwa agar Columbia dan Brucella secara signifikan lebih efektif untuk menumbuhkan spesies *Enterohepatic helicobacter*. Hal ini dikarenakan komposisi di dalam agar Columbia dan Brucella lebih baik untuk menumbuhkan spesies bakteri tertentu, dalam hal ini *Enterohepatic helicobacter*.¹⁴

Penelitian yang dilakukan oleh Zeraik, *et al.* menyatakan bahwa bakteri dapat tumbuh dengan baik pada media yang memiliki nutrisi yang tinggi dan pertumbuhannya akan menu-

run pada media dengan nutrisi yang kurang atau sedikit¹⁵.

SIMPULAN

Hasil viabilitas seluruh kelompok coba menunjukkan 100% viabel (9 dari 9 tabung bakteri dengan kondisi yang diujikan) mengalami pertumbuhan yang ditandai dengan kekeruhan. Terdapat penurunan jumlah bakteri pada sebagian besar hasil pengamatan selama 270 hari penyimpanan. Setelah dilakukan uji SPSS dengan *General Linear Model*, maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang signifikan pada media preservasi dan suhu penyimpanan terhadap pertumbuhan bakteri *B.subtilis* ATCC 6633. Penelitian ini masih memiliki banyak kekurangan, seperti jumlah sampel yang terlalu sedikit, risiko kontaminasi, dan keterbatasan alat dan bahan. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan dengan memilih metode enumerasi yang berbeda seperti metode agar tuang dan pengontrolan suhu secara maksimal yang dilakukan setiap bulannya

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada dr. Lucky H. Moehario, Ph.D., Sp.MK yang telah memberikan pencerahan dalam pembuatan artikel.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alonso S. Novel preservation techniques for microbial cultures. In: Food Engineering Series. Springer; 2016. p. 7–33.
2. Oxoid - Product Detail [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CL1007&cat=&sec

- =2&c=UK&lang=EN
3. She RC, Petti CA. Procedures for the storage of microorganisms. In: Manual of Clinical Microbiology [Internet]. ASM Press; 2015 [cited 2021 May 20]. p. 161–8.
 4. Kaiser G. Factors that influence bacterial growth. In: Microbiology ([https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Kaiser\)/Unit_7%3A_Microbial_Genetics_and_Microbial_Metabolism/17%3A_Bacterial_Growth_and_Energy_Production/17.2%3A_Factors_that_Influence_Bacterial_Growth](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Kaiser)/Unit_7%3A_Microbial_Genetics_and_Microbial_Metabolism/17%3A_Bacterial_Growth_and_Energy_Production/17.2%3A_Factors_that_Influence_Bacterial_Growth))
 5. Sadhu SP. Effect of cold chain interruptions on the shelf-life of fluid pasteurised skim milk at the consumer stage. Braz J Food Technol [Internet]. 2018;21:e2017064.
 6. Wiebe WJ, Sheldon WM, Pomeroy LR. Bacterial growth in the cold: evidence for an enhanced substrate requirement. Appl Environ Microbiol. 1992 Jan;58(1):359-64.
 7. Bacillus subtilis | Microchem Laboratory [Internet]. [cited 2020 Apr 29]. Available from: <https://microchemlab.com/microorganisms/bacillus-subtilis>
 8. Earl AM, Losick R, Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Vol. 16, Trends in Microbiology. NIH Public Access; 2008. p. 269–75.
 9. Lu Z, Guo W, Liu C. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. J Vet Med Sci [Internet]. 2018 [cited 2020 Oct 8];80(3):427–33.
 10. Beales N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. Compr Rev Food Sci Food Saf [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2021 Apr 23];3(1):1–20.
 11. Mohr PW, Krawiec S. Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles and thermophiles. J Gen Microbiol. 1980 Dec;121(2):311-7.
 12. Jordan RC, Jacobs SE. The effect of temperature on the growth of *Bacterium coli* at pH 7-0 with a constant food supply. J Gen Microbiol [Internet]. 1947 Jun 1 [cited 2021 Apr 23];1(2):121–36.
 13. Davis KER, Joseph SJ, Janssen PH. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2005 Feb [cited 2021 Apr 21];71(2):826–34.
 14. Ochoa S, Martínez OA, Fernández H, Collado L. Comparison of media and growth conditions for culturing enterohepatic *Helicobacter* species. Lett Appl Microbiol [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 21];69(3):190–7.
 15. Zeraik AE, Nitschke M. Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. Brazilian Arch Biol Technol. 2012;55(4):569–76.