

# *Lactobacillus rhamnosus*'un Sünme (Rope) Hastalığı Etkeni Olan *Bacillus* Cinsi Bakteriler Üzerine İnhibitör Etkisinin Unlarda Araştırılması<sup>§</sup>

Selçuk ARSLAN\*, Zerrin ERGİNKAYA\*, Mehmet ÖZASLAN\*\*, İ. Halil KILIÇ\*\*, Emel ÜNAL\*

\* Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

\*\* Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü

## ÖZET

**Amaç:** On üç farklı ekmeklik undan izole edilen, 20 *Bacillus* spp. izolatının sünme etkeni olup, olmadıkları ve bu izolatlar üzerine probiyotik özellikte olan *Lactobacillus rhamnosus*'un, inhibisyon etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** İnhibisyon etki invitro olarak *L. rhamnosus*'a ait 24 ve 48 saatlik hücre ve kültür üst sıvısında, agar difüzyon ve sıvı ortamda incelenmiştir. Ayrıca *L. rhamnosus*'un *Bacillus subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi ekmeklik undan elde edilen hamurda incelenmiştir.

**Bulgular:** *L. rhamnosus*'un *Bacillus* spp. üzerine inhibisyon etkisi sıvı ortamda, 20 izolatın 6 tanesinde gözlenmiştir. Agar difüzyon metodu ile belirlenen yöntemde, 24 saatlik inkübasyon sonunda *L. rhamnosus* kültür üst sıvısına 6 *Bacillus* sp. izolatı, *L. rhamnosus* hücrelerin ise 5 *Bacillus* sp. izolatı direnç göstermiştir. Kültür üst sıvısının 48 saatlik inkübasyonunda direnç gösteren izolat sayısı aynı kalırken, hücrede ise izolatların hepsi duyarlı olmuştur. *B. subtilis* ilave edilen hamurda 24 saat sonunda *B. subtilis* sayısı,  $1.3 \times 10^4$  kob/g'dan  $> 1 \times 10^9$  kob/g'a yükselirken, *B. subtilis* ve *L. rhamnosus* ile beraber yapılan ekimde 24 saat sonucunda  $2.9 \times 10^4$  kob/g olarak bulunmuştur. Araştırmada kullanılan unlardan yapılan rope sayımında, en fazla kontaminasyon, fırınlarından alınan unlarda gözlenirken, en az kontaminasyon organik unlarda gözlenmiştir.

**Sonuç:** *L. rhamnosus*'un rope etkeni olan *Bacillus* spp. üzerine inhibisyon etkisi agar difüzyon, sıvı ortamda ve hamurda gözlenmiştir. Böylece insan sağlığına zararlı kimyasal koruyucuların yerine, insan sağlığına yararlı probiyotik biyokoruyucuların kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus* spp., rop sporu

## SUMMARY

**The Inhibitory Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on *Bacillus* Genus as Rope Disease Agent, in Flour Medium**

**Objective:** In this study, 20 *Bacillus* spp. isolates, which have been isolated from 13 different bread flour, whether they were rope factor has been aimed to investigate and then inhibitory effect of *Lactobacillus rhamnosus*, which have probiotic properties, has been aimed to examine on the *Bacillus* isolates.

**Materials and Methods:** The inhibitory effect of *L. rhamnosus* on *Bacillus* spp. was investigated in vitro both in agar diffusion and in liquid medium using the cell and supernatant of 24-hour and 48-hour *L. rhamnosus* culture. In addition, antibacterial influence of *L. rhamnosus* on *Bacillus subtilis* was tested in bread dough.

**Results:** The inhibitory effect of *L. rhamnosus* on *Bacillus* spp. was detected in 6 of the 20 *Bacillus* isolates in liquid medium. The results obtained by the agar diffusion method revealed that 6 *Bacillus* sp. isolates showed resistance to the supernatant of *L. rhamnosus* and 5 *Bacillus* sp. isolates showed resistance to *L. rhamnosus* cell at the end of 24-hour-incubation. Standing isolates remained the same and all isolates in cell were susceptible at the end of 48-hour-incubation with the supernatant. The amount of *B. subtilis* was raised from  $1.3 \times 10^4$  CFU/g to  $1 \times 10^9$  CFU/g in the *B. subtilis* added dough. However, the number of *B. subtilis* was  $2.9 \times 10^4$  CFU/g at the end of 24 hours in *L. rhamnosus* simultaneously added dough. During the counting of rope in flour, which has been used in study, maximum contamination was seen in oven flour, minimum contamination also was seen in organic flour.

**Conclusion:** The inhibitory effect of *L. rhamnosus* to the rope agent *Bacillus* spp. was observed in agar diffusion, liquid medium and the dough. The results of this study emphasized the use of probiotic bio-protects beneficial for human health as additives in bread instead of the use of harmful chemicals as additives.

**Key words:** *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus* spp., rop spor

**Alındığı tarih:** 18.06.2014

**Kabul tarihi:** 30.01.2015

**Yazışma adresi:** Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 27330 Gaziantep

**e-posta:** selcukarslan27@gmail.com

<sup>§</sup> Bu tez çalışması ICAR (International Conference on Antimicrobial Research) poster olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Un kaynaklı birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik sorunlar, önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Gerek, ekmek ve gerekse diğer fırın ürünleri, 0.96–0.98 gibi yüksek su aktivitesi ve 5.2–5.8 pH değerine sahip olmaları nedeniyle, mikroorganizma gelişmesi için uygun ortamlar oluşturmaktadırlar. Bu ürünlerde, sıklıkla karşılaşılan sorunların başında, küf kontaminasyonu ve sünme (rope) oluşumu gelmektedir<sup>(1)</sup>.

Ekmeklerde meydana gelen ve özellikle yaz aylarında ortaya çıkan sünme hastalığı, bazı sporlu bakteriler tarafından gerçekleştirilen ve özellikle sıcak ve nem oranı yüksek olan yaz aylarında önemli bir sorundur. Bu bakterilerin oluşturduğu sporlar, ekmeklerin fırında pişirilmesi sırasında, ekmek içi sıcaklığının 100°C'yi geçmemesinden dolayı, canlı kalmakta ve ekmek içinin yaklaşık 40°C'ye soğumasından sonra, tekrar vejetatif hâle dönerek, hızla çoğalmaktadırlar<sup>(2)</sup>.

Sünme, üründe genellikle sporlarının ısıya daha dirençli olmasından dolayı başta, *Bacillus mesentericus* olmak üzere, birçok *Bacillus* türlerinin üründe gelişmesiyle ortaya çıkmaktadır<sup>(1,3)</sup>. Bu türler *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* ve *B. cereus*'dur<sup>(4-7)</sup>. *B. subtilis* sporlarına, unda ve ender olarak da ekmek yapımında kullanılan mayada rastlanmaktadır<sup>(1)</sup>.

*Bacillus* cinsi bakteriler, genelde toprak kökenlidirler. Hasat öncesi ve sonrası buğday tanesinin dış kısmında bulunmaktadır. Bu bakterilerin sporları, özellikle büyük somun ekmeklerinin orta noktalarındaki pişirme sıcaklığına dayanabilmektedir. Ekmekler soğutulduktan sonra, çimlenerek 0.95 su aktivitesi düzeyinde kolayca gelişebilmektedir. Pişirme sonucu, ortamda kalan spor sayısı, başlangıçtaki spor sayısına ve pişirme koşullarına bağlı olup, ılıman iklimlerde, doğal ve katkı ilave edilmeyen ekmeklerde,

daha yüksek sayılarda olmaktadır<sup>(8)</sup>.

İyi temizlenmemiş buğdaylardan elde edilen unların, değirmenlerde unun elde edilmesi ve depolanması sırasında, bu bakterilerle kontamine olma riski yüksek olmaktadır. Ayrıca, ekmek yapımında kullanılan un, maya gibi katkı maddeleri, su ve yetersiz hijyen koşullarından dolayı da, ekmeğe sünme sporlarının bulaşması söz konusu olabilmektedir<sup>(9)</sup>.

Patojenlerin inhibisyonunda kullanılan ısı işlem uygulaması, katkı maddelerinin kullanımı gibi klasik yöntemlerin yanı sıra modern işleme ve koruma yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, özellikle son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talebi artmıştır. Bu amaçla kullanılan biyokoruyucular arasında, probiyotik özellikteki laktik asit bakterilerinin yanı sıra ürettikleri metabolitleri kullanım alanı bulmaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, *Bacillus* spp'nin bazı türlerinin gıdalarda çok ciddi bozulmalara neden olduğunu göstermiştir. *B. cereus*'un psikrotrof serotipleri ile kontamine olan süt ve ürünlerinin, halk sağlığı açısından risk taşıdığı, kontamine süt ve ürünlerinin soğukta korunması sırasında, psikrotrof serotiplerin üreyerek toksin oluşturdukları bildirilmiştir<sup>(10)</sup>. *Bacillus* cinsi bakterilerin gıdalarda, özellikle unlu mamullerde inhibisyonu amacıyla, kalsiyum propiyonat, asetik asit, propiyonik asit gibi kimyasallar kullanılmaktadır<sup>(5-12)</sup>.

Gıdalarda starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri (LAB), fermentatif metabolizmaları sonucunda laktik asit üreten, gram (+), bazı durumlarda pseudo-katalaz olmasına karşın, genelde katalaz(-), hareketsiz ve sporsuz bakterilerdir. Tüm laktik asit bakterileri, anaerobik olarak gelişirler, ancak birçoğu fakültatif anaerob veya mikroaerofiliktirler<sup>(13)</sup>.

Yapılan birçok çalışma, LAB'nin *Bacillus* spp. sporları üzerine inhibitör etkisinin, kimyasallar kadar etkili olduğunu göstermiştir<sup>(15,11,14-16)</sup>. *Lactobacillus rhamnosus*'un farklı suşları birçok probiyotik üründe uzun zamandır kullanılmaktadır. En iyi bilinen suşu ise *L. rhamnosus* GG'dir<sup>(17,18)</sup>. *L. rhamnosus*'un bu özel suşunun birçok yararlı etkisi olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır<sup>(19,20)</sup>.

Bu çalışmada, *L. rhamnosus*'un *Bacillus* spp. sporları üzerine inhibitör etkisinin; agar difüzyon, sıvı ortam ve ekmek hamuru içerisinde belirlemek ve hâlen ekmeklik unlarda sünme (rope) etkeni sporlara karşı ticari olarak kullanılan antimikrobiyal maddelere alternatif olarak LAB'ın kullanma olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan 3 adet organik, 2 adet durum ve 8 adet buğday unu örnekleri, Gaziantep'te bulunan bazı un ve ekmek fabrikaları ile marketlerden Temmuz ayında temin edilmiştir. Ayrıca, hiçbir katkı maddesi kullanılmadan organik üretim yapan tesislerden de organik un temin edilmiştir.

Araştırmada ayrıca, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarı mikroorganizma koleksiyonundan temin edilen *B. subtilis* ile Danisco® (ABD)'dan temin edilen *L. rhamnosus* kültürü kullanılmıştır.

*L. rhamnosus*, LAB içerisinde antibakteriyel etki gösteren fakültatif heterofermentatif (Grup II) özellikte olup, pentozları ve glukogonları fermente edebilme yeteneğine sahiptir<sup>(21)</sup>. Yapılan çalışmalara bu suşun, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* ve *Enterococcus faecium* gibi patojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur<sup>(22)</sup>.

**Un örneklerinden *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyonu.** Ekmeklik un örneklerinden, 10 g tartılarak, 90 mL steril serum fizyolojik içerisine, aseptik koşullarda aktarılmıştır. Karıştırma işleminden sonra örnekler, su banyosunda 65°C'de 60 dakika tutularak, vejetatif formlarının ölmesi ve ortamda bu bakterilerin sporlu formlarının kalması sağlanmıştır. Örneklerin, 10<sup>-1</sup>'den 10<sup>-7</sup>'ye kadar seyreltmeleri yapılarak, yayma ekim yöntemiyle Nutrient agar (NA) besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. 30°C'de, 5 gün, inkübasyona bırakılan petrielerde, gelişen koloniler değerlendirilerek, *Bacillus* şüpheli kolonilerden gram boyama, spor boyama ve katalaz testleri yapılmıştır. Gram (+), sporlu, katalaz pozitif izolatlar, saflaştırılarak, spor morfolojileri, 15 ve 45°C'lerde hareket özellikleri ve kısaca IMVC (İndol, Metil kırmızısı, Voges Proskauer, Sitrat kullanımı) olarak bilinen tanımlama testleri uygulanarak, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de belirtilen sonuçlara göre *Bacillus* cinsi bakteri olup olmadıkları belirlenmiştir<sup>(24)</sup>.

**Un örneklerinde sünme (rope) varlığının belirlenmesi.** 50 g ekmeklik un, 450 mL %0.1'lik peptonlu su içinde homojenize edilerek, 10<sup>-1</sup>'lik dilüsyon hazırlanmıştır. Rope sporu sayımı için, 10<sup>-1</sup>'lik dilüsyon kaynar su banyosunda, 30 dakika bekletilmiş ve bekleme süresince, her 5 dakika bir karıştırma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra, bu karışımdan, 10<sup>-2</sup> ve 10<sup>-3</sup>'lük dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her üç dilüsyondan, içerisinde 10 mL steril glikoz tripton broth bulunan üç tüpe, 1'er mL ekim yapılmıştır. 30°C'de, 48 saat inkübe edilen tüplerden, yüzeyde zar oluşturanlar pozitif kabul edilerek örneklerin gramındaki sünme sayısı en olası sayı (EMS) tablosuna göre hesaplanmıştır<sup>(24)</sup>.

***L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine antibakteriyel etkisinin belirlenmesi.** MRS Broth besiyerinde çoğaltılan *L. rhamnosus*,

mL'de  $10^5$  konsantrasyonda hücre olacak şekilde seyreltme işlemi yapıldıktan sonra, hücre süspansiyonu, 5000 devir/dakika 10 dakika santrifüj edilerek, hücre ve kültür üst sıvısını ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Unlardan izole edilen ve nutrient agar besiyerinde geliştirilen *Bacillus* izolatlarından, bir koloni alınmış, içerisinde, nutrient broth besiyeri bulunan tüplere inoküle edilerek,  $30^\circ\text{C}$  de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, seri seyreltmeler ile mL'de  $10^6$  konsantrasyon hücre olacak şekilde, seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *Bacillus* süspansiyonu, *L. rhamnosus*'un, agar kuyu difüzyon yöntemi ve sıvı ortamda, antibakteriyel etkisinin belirlenmesinde ön kültür olarak kullanılmıştır.

**Agar difüzyon yöntemi ile *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine antibakteriyel etkisinin belirlenmesi.** Agar kuyu difüzyon yöntemi ile *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine antibakteriyel etkilerinin belirlenmesinde;  $10^6$  konsantrasyondaki *Bacillus* izolatı, Plate Count Agar (PCA) besiyerine, dökme ekim yöntemi ile ekilmiştir. Besiyeri üzerinde açılan 10 mm'lik kuyucuklara, *L. rhamnosus*'a ait kültür üst sıvısı ve hücre süspansiyonu, ayrı plaklarda olmak üzere, 100'er  $\mu\text{L}$  eklenmiştir. Ayrıca, bir kuyucuğa da, yalnızca steril besiyeri ilave edilerek, kontrol olarak değerlendirilmiştir.  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra, kuyucuk etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek, Tablo 1'e göre, antibakteriyel etki olarak değerlendirilmiştir<sup>(25)</sup>.

**Sıvı ortamda *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine antibakteriyel etkisinin belirlenmesi.**  $10^6$ 'lık konsantrasyonda, *Bacillus* izolatları içeren 10 mL'lik Nutrient broth besiyerine,  $10^5$  konsantrasyonda *L. rhamnosus* hücre süspansiyonundan 1 mL ilave edilmiştir. Aynı deneme, *L. rhamnosus*'dan elde edilen kültür üst sıvısı için de (1 mL) uygulanmıştır. Kontrol örneği olarak, *L. rhamnosus* içermeyen, yalnızca  $10^6$

konsantrasyonda *Bacillus* izolatı içeren, 10 mL nutrient broth kullanılmıştır. Her karışımdaki *Bacillus* canlı sayısını belirlemek için, PCA'ya dökme ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. Daha sonra tüm örnekler,  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında *Bacillus* sayımları gerçekleştirilmiştir<sup>(26,27)</sup>.

Ekmek hamurunda *L. rhamnosus*'un, *B. subtilis* üzerine antibakteriyel etkisinin belirlenmesi, 25 g steril ekmeçlik una,  $10^4$  konsantrasyonda *B. subtilis* ve  $10^4$  konsantrasyonda *L. rhamnosus* içeren 5'er mL sıvı süspansiyonlar karıştırılarak (1/5 oranında), yumuşak kıvamlı hamur yapılmıştır. Kontrol olarak, steril bir kapta, yalnızca  $10^6$  konsantrasyonda, *B. subtilis* içeren süspansiyon, una ilave edilerek, hamur elde edilmiştir. Her iki karışımdan  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$ 'lik dilüsyonlar hazırlanarak, dökme ekim yöntemi ile PCA'ya ekim yapılmıştır. Daha sonra hamurlar,  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yirmi dört saatlik inkübasyondan sonra, *Bacillus* sayımları gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR

Denemede kullanılan 13 un örneğinden 20 *Bacillus* izolatı elde edilmiştir. Bu suşların 4'ü organik undan, 1'i durum buğday unundan, 15'i ise buğday unundan izole edilmiştir. İzolatların örneklere göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Un örneklerinde sünme etkeni olan rop sporu varlığı araştırılarak, sayım sonuçları, EMS tablosundan yararlanılarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 1. İnhibisyon yeteneğinin değerlendirilmesinde kullanılan Kirby-Bauer Disk difüzyon yönteminde zon çapları<sup>(28)</sup>.**

Zon çapı (mm)	İnhibisyon aktivitesi
Görülmedi	-
<10	(+)
10-14	(++)
15-19	(+++)
>20	(++++)

(-) Dirençli, (+): Az dirençli, (++) Orta hassas, (+++): Hassas, (++++): Çok hassas

Tablo 2. *Bacillus* izolatlarının elde edildiği un örnekleri.

Örnek	İzolat Sayısı	İzolat No		
O1	2	O1-1	O1-2	-
O2	1	O2-1	-	-
O3	1	O3-1	-	-
ŞA-M	1	ŞA-M-1	-	-
GÜ-P	1	GÜ-P-1	-	-
Bİ-M	2	Bİ-M-1	Bİ-M-2	-
SÜ-F	1	SÜ-F-1	-	-
SÖ-M	2	SÖ-M-1	SÖ-M-2	-
ÖZ-P	2	ÖZ-P-1	ÖZ-P-2	-
SÜD-F	1	SÜD-F-1	-	-
GE-F	1	GE-F-1	-	-
Tİ-F	3	Tİ-F-1	Tİ-F-2	Tİ-F-3
BE-F	2	BE-F-1	BE-F-2	-

Tablo 3. Un örneklerinde belirlenen rope sporu sayım sonuçları

Örnek	ROPE
Bİ-M	40 EMS/g
GE-F	150 EMS/g
BE-F	90 EMS/g
SÖ-M	90 EMS/g
O2	90 EMS/g
O1	90 EMS/g
O3	95 EMS/g
Tİ-F	95 EMS/g
SÜ-F	250 EMS/g
SÜD-F	90 EMS/g
ÖZ-P	450 EMS/g
ŞA-M	450 EMS/g
GÜ-P	450 EMS/g

Tablo 3'te un örneklerinde belirlenen rope sporu sayıları verilmiştir.

Rope sayımı sonunda en fazla kontaminasyon fırınlardan alınan örneklerde tespit edilirken, en az kontaminasyon, organik unlarda tespit edilmiştir. Forsythe ve Hayes, 1998'de yaptıkları çalışmada, uygun hijyenik koşullarda üretilmeyen hamurlarda, yapım sırasında, sünme sporlarında artışlar olduğunu ve bu hamurlarla yapılan ekmeklerde de sünme hastalığı gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Kontaminasyonun en fazla fırınlarda olmasının nedeni olarak, unların fırınlara gelene kadar birçok aşamasından (üretim, paketlenme, depolama, sevkiyat) geçmesi ve bu aşamalardan sonra fırınlarda üretim sırasında, unun kontaminasyona daha açık olması düşünülmektedir.

Tablo 4. *L.rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine inhibisyon etkisi (Agar kuyu difüzyon yöntemi).

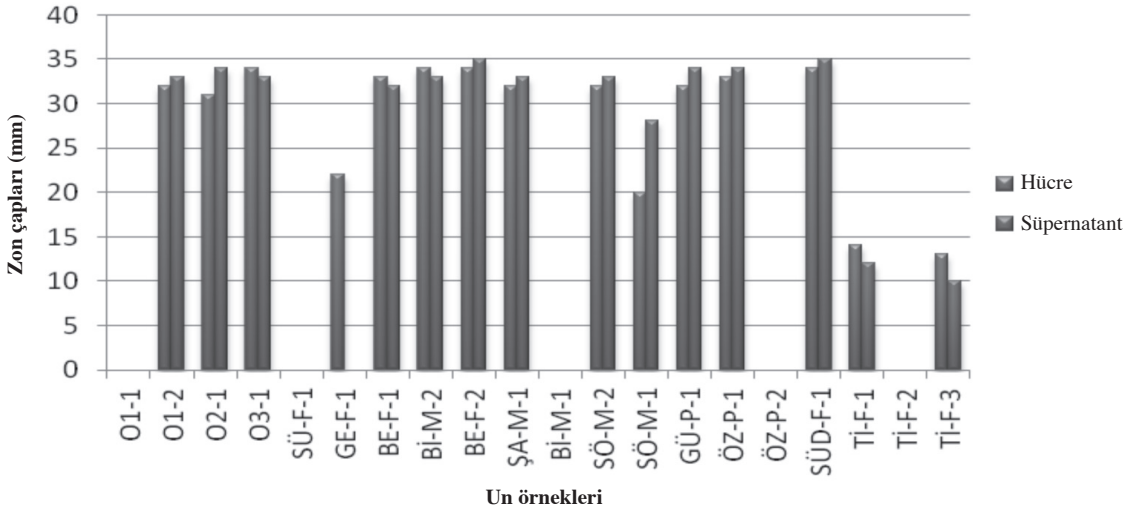
Örnek	İnkübasyon			
	24 Saat		48 Saat	
	Kültür Üst Sıvısı	Hücre	Kültür Üst Sıvısı	Hücre
O1-1	-	-	-	++++
O1-2	++++	++++	++++	++++
O2-1	++++	++++	++++	++++
O3-1	++++	++++	++++	++++
SÜ-F-1	-	-	-	++++
ŞE-F-1	-	++++	++++	++++
BE-F-1	++++	++++	++++	++++
Bİ-M-2	++++	++++	++++	++++
BE-F-2	++++	++++	++++	++++
ŞA-M-1	++++	++++	++++	++++
Bİ-M-1	-	-	-	++++
SÖ-M-2	++++	++++	++++	++++
SÖ-M-1	++++	++++	++++	++++
GÜ-P-1	++++	++++	++++	++++
ÖZ-P-1	++++	++++	++++	++++
ÖZ-P-2	-	-	-	++++
SÜD-F-1	++++	++++	++++	++++
Tİ-F-1	++	++	-	++++
Tİ-F-2	-	-	-	++++
Tİ-F-3	++	++	++++	++++

(-) Dirençli, (+): Az dirençli, (++) Orta hassas, (+++): Hassas, (++++): Çok hassas

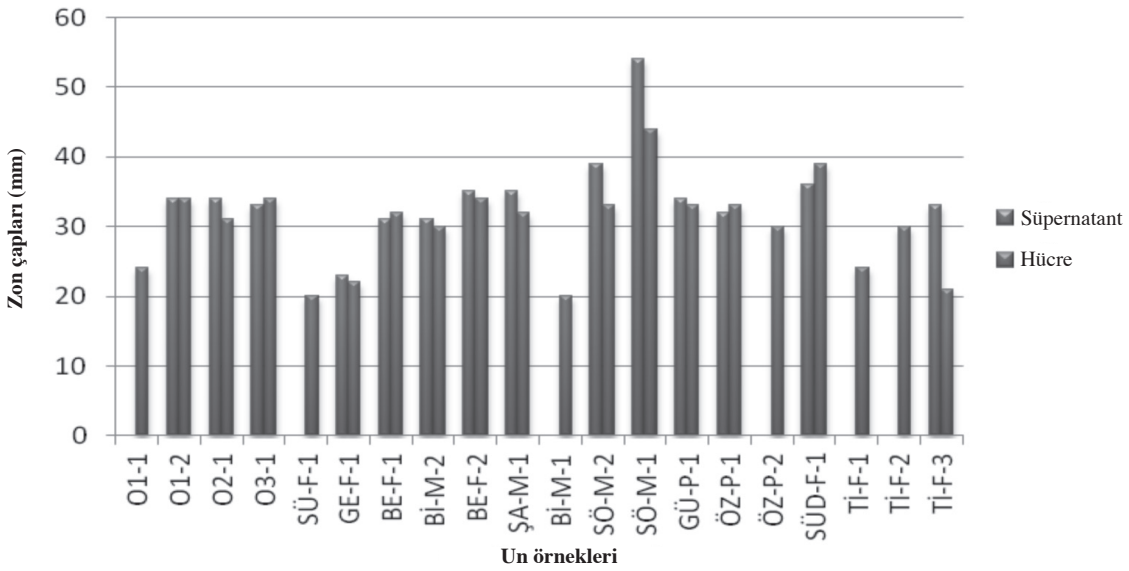
*L. rhamnosus*'un, *Bacillus* izolatları üzerine inhibisyon etkisi, hem direkt hücre süspansiyonu hem de kültür üst sıvısı kullanılarak, agar kuyu difüzyon yöntemi ile inkübasyonun, 24. ve 48. saatlerinde belirlenmiş ve oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülerek değerlendirilmiştir (Tablo 4; Resim 1-4; Grafik 1, 2).

Marketlerden alınan unlardan izole edilen beş *Bacillus* izolatıyla (Bİ-M-2, ŞA-M-1, Bİ-M-1, SÖ-M-2, SÖ-M-1) yapılan çalışmada, ilk 24 saatte yalnızca bir izolat, (Bİ-M-1) hem kültür üst sıvısında hem de hücrede dirençli bulunurken, aynı izolat, 48 saatlik inkübasyonun da yalnızca kültür üst sıvısına direnç göstermiştir.

Fırınlardan alınan unlardan izole edilen üç izolatın, (GÜ-P-1, ÖZ-P-1, ÖZ-P-2) yalnızca biri, (ÖZ-P-2) ilk 24 saatte hem kültür üst sıvısına hem de hücrede dirençli bulunurken, aynı izolat, 48 saatlik inkübasyonun sonunda yalnızca kültür üst sıvısına direnç göstermiştir. Organik unlardan alınan örneklerden elde edilen dört



Grafik 1. *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine inhibitör etkisi (24 saatlik inhibisyon).



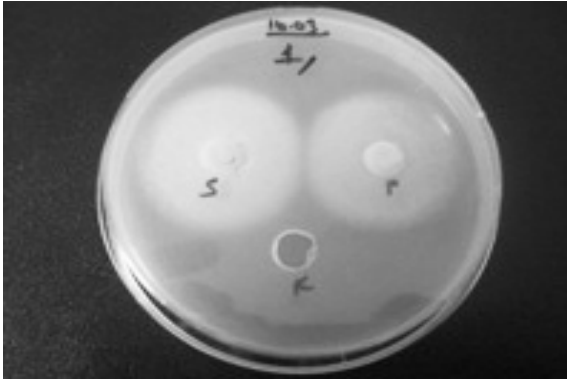
Grafik 2. *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatları üzerine antibakteriyel etkisi (48 saatlik inhibisyon).

izolattan, (O1-1, O1-2, O2-1, O3-1) yalnızca bir tanesinin, (O1-1) ilk 24 saatlik inkübasyon sonucunda, hem kültür üst sıvısına hem de hücre süspansiyonuna dirençli olduğu belirlenirken, aynı izolatın 48 saatlik inkübasyonu sonucu, yalnızca kültür üst sıvısına karşı dirençlilik göstermiştir.

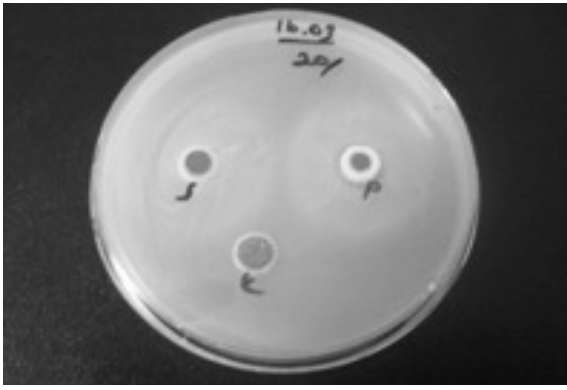
Fabrikalardan alınan örneklerden elde edilen 8 izolattan 3'ünde direnç gözlenmiştir. Bunlardan 2'sinin (SÜ-F-1, Tİ-F-2) 24 saatlik inkübasyonda hem kültür üst sıvısı hem de hücre süspansi-

yonuna karşı dirençli bulunurken, aynı izolatların, 48 saatlik inkübasyonu sonucu, yalnızca kültür üst sıvısına direnç gösterdikleri bulunmuştur. Üçüncü izolat (GE-F-1) ise, 24 saatlik inkübasyonda yalnızca kültür üst sıvısına direnç göstermiştir.

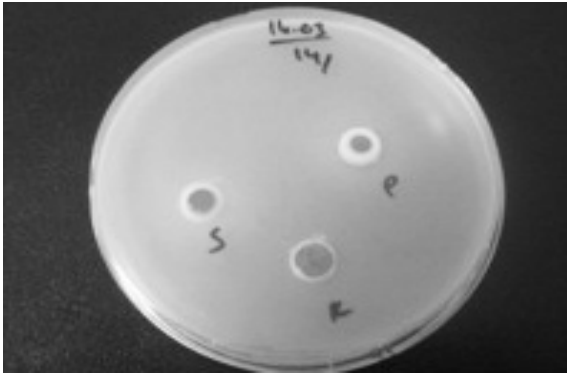
*L. rhamnosus* hücre süspansiyonu *Bacillus* spp.'ler üzerine daha inhibitif etki göstermiştir. Ayrıca inkübasyon süresi uzadıkça, *L. rhamnosus*'un, inhibitif etkisinin arttığı görülmüştür.



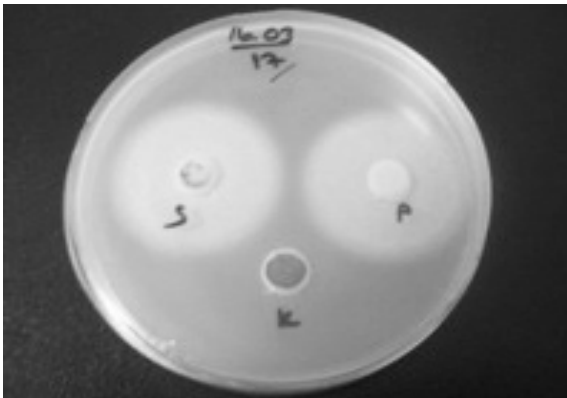
Resim 1. O3-1



Resim 2. O1-2



Resim 3. Tİ-F-2



Resim 4. BE-F-2

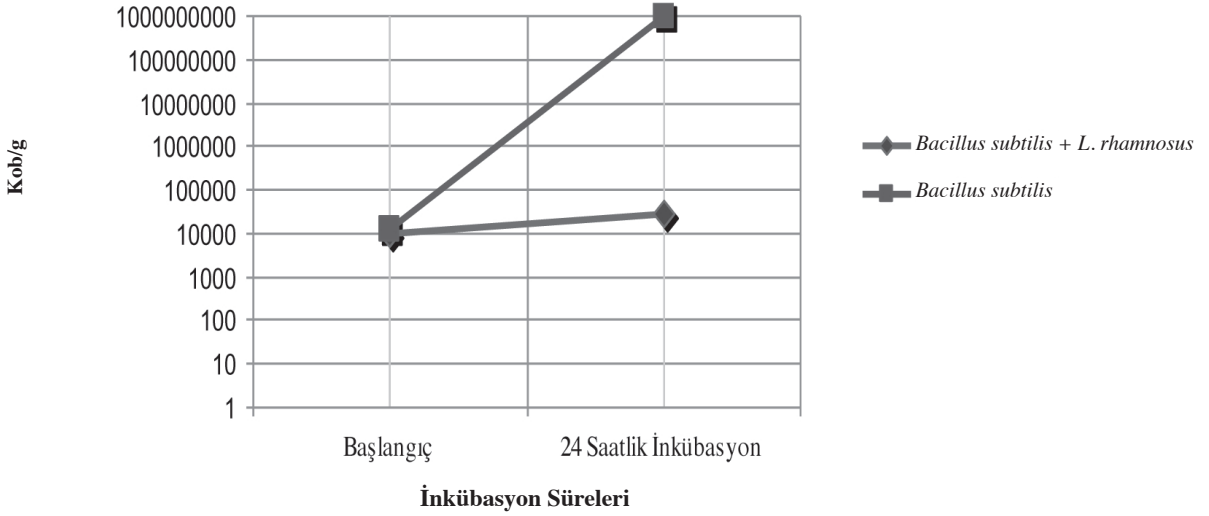
Tablo 5. Sıvı ortamda, *L. rhamnosus*'un *Bacillus* spp. üzerine inhibisyon etkisi.

Örnek	Başlangıç (kob/g)	24. saatlik inkübasyon sonrası (kob/g)
O3-1	$>1 \times 10^9$	$>1 \times 10^9$
ŞA-M-1	$1.9 \times 10^7$	$1 \times 10^6$
GÜ-P-1	$7.7 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$
Bİ-M-1	$1 \times 10^7$	Bulunamadı
SÜ-F-1	$1 \times 10^7$	$>1 \times 10^9$
SÖ-M-1	$1.2 \times 10^2$	$4.1 \times 10^5$
ÖZ-P-1	$1.6 \times 10^7$	$4.5 \times 10^6$
ÖZ-P-2	$>1 \times 10^9$	$>1 \times 10^9$
O2-1	$5.8 \times 10^6$	$>1 \times 10^9$
SÜD-F-1	$2.5 \times 10^7$	$7 \times 10^6$
SÖ-M-2	$1.8 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^9$
GE-F-1	$1.9 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^9$
Tİ-F-1	$>1.0 \times 10^9$	$>1.0 \times 10^9$
Tİ-F-2	$>1.0 \times 10^9$	$>1.0 \times 10^9$
BE-F-1	$>1.0 \times 10^9$	$>1.0 \times 10^9$
Bİ-M-2	$1.9 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^9$
BE-F-2	$2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^9$
Tİ-F-3	$>1.0 \times 10^9$	$>1.0 \times 10^9$
O1-1	$>1.0 \times 10^9$	$>1.0 \times 10^9$
O1-2	$2.6 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^9$
<i>B. subtilis</i>	$1.0 \times 10^7$	$8.3 \times 10^6$
Kontrol	$1.2 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^9$

*L. rhamnosus*'un, *Bacillus* izolatları üzerine inhibisyon etkisi sıvı ortamda belirlenip sonuçlar kob/ml olarak değerlendirilmiştir (Tablo 5).

*Bacillus* izolatlarından 3'ünde (Bİ-M-1, ÖZ-P-1, SÜD-F-1) *L. rhamnosus*'un, inhibisyon etkisi gözlenmiştir. *L. rhamnosus*'un, *Bacillus subtilis* üzerine inhibisyon etkisinin sıvı ortamda araştırılmasında ise başlangıçta  $1.0 \times 10^7$  kob/g olan spor sayısı, 24 saatlik inkübasyondan sonra  $8.3 \times 10^6$  kob/g'a inmiştir.

Steril edilmiş ekmeklik undan elde edilen hamura  $10^4$  kob/mL *B. subtilis* ve aynı sayıda *L. rhamnosus* ( $10^4$  kob/mL) ilave edildikten sonra,  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, *B. subtilis* sayısında bir azalma söz konusu olmayıp, hemen hemen aynı sayıda kalmıştır. Ancak, kontrol örneğinde hızlı bir artış olması, hamur içerisinde *L. rhamnosus*'un *B. subtilis*'in gelişimini önlediğini göstermektedir (Tablo 6, Grafik 3). Sıvı



Grafik 3. Hamurda *L. rhamnosus*'un *B. subtilis* üzerine inhibisyon etkisi.

Tablo 6. *L. rhamnosus*'un *Bacillus subtilis* üzerine inhibisyon etkisinin hamurda araştırılması.

Bakteriler	Başlangıç <i>B. subtilis</i> (kob/g)	24 saatlik inkübasyon <i>B. subtilis</i> (kob/g)
<i>B. subtilis</i>	$1.3 \times 10^4$	$>1 \times 10^9$
<i>B. subtilis</i> + <i>L. rhamnosus</i>	$1 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$

ortamda izlenen inhibisyon etkide (Bİ-M-1, ÖZ-P-1, SÜD-F-1)  $10^{11}$ 'lik bir azalma gözlenirken, hamurda yapılan çalışmada biyositatik bir etki göstermiştir.

## TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada probiyotik özelliğe sahip *Lactobacillus rhamnosus*'un, unlarda sünme (rope) hastalığı etkeni olan *Bacillus* spp. üzerine, inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, *L. rhamnosus*'un *Bacillus* spp. üzerine antibakteriyel etkisi, agar kuyu difüzyon yönteminin yanı sıra, sıvı ortamda ve hamurda belirlenmiştir.

Alınan tüm örneklerin hepsinde rope tespit edilmiş olup, en fazla kontaminasyon fırınlarda

tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak, unların fırınlara gelene kadar birçok aşamadan (üretim, paketlenme, depolama, sevkiyat) geçmesi ve üretim sırasında unun kontaminasyona açık olması düşünülmektedir. En az kontaminasyon ise organik unlarda tespit edilmiştir. Un üretiminde, tarladan satış sahasına kadarki aşamalarda (hasat, üretim, paketlenme, depolama, sevkiyat) kontaminasyonun daha da arttığı belirlenmiştir. Un üretiminde hijyen kurallarına uyulması ve ekmek yapım aşamasında, biyokoruyucuların kullanılması, rope gelişmesini engelleyecektir.

Agar kuyu difüzyon yöntemiyle yapılan inhibisyon araştırmalarında, *L. rhamnosus* hücre süspansiyonunun antibakteriyel etkisi, kültür üst sıvısına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. *L. rhamnosus*'un ürettiği laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür ve bakteriyosin gibi metabolitler kültür üst sıvısında etkili olmaktadır. *L. rhamnosus* hücresinin direk kullanılması ile antibakteriyel etkideki artışın nedeni ise, ortamdaki besinlere karşı rekabet veya endojen özellikteki bir başka antibakteriyel etkili faktör olabileceği düşünülmektedir.



Sıvı ortamda yapılan inhibisyon araştırmasında, *L. rhamnosus*'un *Bacillus* izolatlarından 3 tanesinde (vejetatif hücre) inhibisyon etkisi gösterirken, *Bacillus subtilis* üzerine inhibisyon etkisinde ise başlangıçta  $1.0 \times 10^7$  kob/g olan spor sayısı, 24 saatlik inkübasyondan sonra  $8.3 \times 10^6$  kob/g'a inmiştir.

Hamurda yapılan inhibisyon araştırmasında ise pH, besin maddesi, nem vb. etmenlerin olumsuz etkilerinden dolayı *L. rhamnosus*, *B. subtilis* üzerine biyositatik bir etki göstermiştir. Agar kuyu difüzyon, sıvı besiyerinde ve hamurda da antibakteriyel etkinin görülmesi, *L. rhamnosus*'un biyokoruyucu olarak uygulanabilirliğini göstermiştir.

Bu çalışmada bulunan laktik asit bakterilerinin sünme etkeni *Bacillus*'lar üzerine antagonist etkisi, araştırmanın genişletilerek farklı unlardan elde edilen hamurlarda ve diğer laktik asit bakterileri ile de denenmesi ve LAB'in etkili olduğu inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Böylece, koruyucu olarak kullanılan ve insan sağlığına zararlı olan kimyasal maddelere alternatif olarak doğal ve probiyotik olan biyokoruyucuların kullanılmasına yönelik kesin bulgular elde edilmiş olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. **Jenson I.** Bread and Baker's Yeast. In: Wood JBB (Ed) Microbiology of Fermented Foods. Blackie Academic & Professional, Londra, İngiltere, 1998; 172-98. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_7)
2. **Vangöl Y.** Ekmekte Rope hastalığı, Yeniğün Gazetesi, Ortam Yayıncılık AŞ, 03.06.2006.
3. International Commission on Microbiological Specification for Foods, Cereals and cereal products. In: Microbial Ecology of Foods. Microorganisms in Foods 6. Blackie Academic & Professionals, Londra, İngiltere, 1998; 313-55.
4. **Adams MR, Moss MO.** Food microbiology. Royal Society of Chemistry, Cambridge, İngiltere, 1995.
5. **Rosenquist H, Hansen A.** The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. *J Appl Microbiol* 1995; 85:621-31. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.853540.x>
6. **Thompson JM, Waites WM, Dodd CER.** Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *J Appl Microbiol* 1998; 85:481-6. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.853512.x>
7. **Von Holy A.** Rope spoilage of bread. *Food Indust* 1994; 47:13-5.
8. Anonymous, 2008b, <http://www.gidacilar.net/sünme-hastaligi-t371.html>
9. **Aran N, Boyacıoğlu MH.** Rope hastalığı. <http://www.baserun.com.tr/baser-un-laboratuvar/ekmekte-rope-hastaligi.html> Erişim tarihi: 2006.
10. **Özdemir H.** Pastörize sütlerde *Bacillus cereus*'un varlığı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 2003; 611-5.
11. **Olimpia P, Giuseppe B, Giancarlo M, Greco T, Francesco V.** Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria, Dipartimento di Scienza delgi Alimenti, Università degli Studi di Napoli Federico II, 80055 Portici, Italy, 2002.
12. **Demir Y.** Trakya bölgesinde üretilen ekmeklik buğday unlarında rop sporu varlığı ve bazı kalite kriterlerinin belirlenmesi, [Yüksek lisans tezi], Tekirdağ: Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 2006.
13. **Axelsson L.** Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: S. Salminen and A. Von Wright, Eds. Lactic acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd ed Marcel Dekker, Inc, New York, 1998.
14. **Spelhaug SR, Harlander SK.** Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J Food Prot* 1989; 52:856-62.
15. **Sameshima T, Magome C, Takeshita K, Arihara K, Itoh M, Kondo Y.** Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausages. *Int J Food Microbiol* 1998; 41:1-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00038-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00038-5)
16. **Messens W, de Vuyst L.** Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs-a review. *Int J Food Microbiol* 2002; 72:31-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00611-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00611-0)
17. **Gorbach SL, Goldin BR.** *Lactobacillus acidophilus* strains of bacteria and compositions thereof. European Patent Specification 0 199 535 B1 (Application number: 86302836.1), 1992.
18. **Alander M, Satokari R, Korpela R, et al.** Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:351-4.
19. **Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T.** Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20:333-8. <http://dx.doi.org/10.1097/00005176-199504000-00012>
20. **Huang J, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ.** Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children. *Dig Dis Sci* 2002; 47:2625-34. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020501202369>
21. **Hessle C, Hanson LA, Wold AE.** Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:276-82. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00885.x>

22. **Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, et al.** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4949-5956.
23. **Kim HS, Lee DW, Woo SD, Yu MY, Kang KS.** Distribution, serological identification, and PCR analysis *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. *Curr Microbiol* 1998; 37:195-200.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s002849900363>
24. **Ünlütürk A, Turantaş F.** Gıdaların mikrobiyolojik analizi düzeltilmiş ikinci baskı. Meta Basım, İzmir, 2002.
25. **Sußmuth R, Eberspacher J, Haag R, Springer W.** Biochemisch Mikrobiologisches Prakticum. Thieme Verlag-Stuttgart, 1987.
26. **Nieto-Lozano JC, Raguera-Useros JI, Pelaez-Martinez MC, De La Torre AH.** Acteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Sci* 2002; 62,237-243.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00252-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00252-2)
27. **Taş E.** Probiyotik laktik asit bakterileri ve baharatların bazı gıda patojenleri üzerine inhibisyon etkisi. [Yüksek lisans tezi], Adana: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 2002.
28. **Rodriguez E, Gonzalez B, Gaya P, Nunez M, Medina M.** Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int Dairy J* 2000; 10:7-15.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00017-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00017-0)