

## ***Bacillus* TÜRLERİNİN PROBİYOTİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Fundagül Erem, Ahmet Küçükçetin, Muharrem Certel\***

Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş tarihi / *Received*: 08.03.2013

Düzeltilerek Geliş Tarihi/ *Received in revised form*: 30.03.2013

Kabul tarihi / *Accepted*: 04.04.2013

### **Özet**

Probiyotiklerin, sağlığa yararlı etkileri nedeniyle çeşitli gıda ürünlerinde kullanılmasının yanı sıra besin takviyesi olarak ya da enfeksiyon hastalıklarının tedavisi amacıyla da giderek daha fazla kullanılmaya başlanması, bu konuda araştırmacıları yeni çalışmalar yapmaya sevk etmiştir. *Bacillus* türleri, sporları ve ürettikleri metabolitleri (enzim, antimikrobiyal madde vs.) aracılığıyla probiyotik özellikler gösterebilmekte ve bu özellikleri ile araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Son zamanlarda bunların probiyotik olarak değerlendirilmeleri ile ilgili çalışmalar yapılmakta ve özellikle de bu bakterilerin insanların kullanımı için güvenli olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu çalışmada; *Bacillus* türlerinin gastrointestinal sistemdeki davranışı, probiyotik olarak etki mekanizmaları ve kullanım olanakları ile ilgili bilgiler derlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Bacillus*, probiyotik, gastrointestinal sistem

## **EVALUATION of *Bacillus* SPECIES AS PROBIOTICS**

### **Abstract**

Due to the beneficial effects to health, probiotics have started to increasingly use as food supplement or for the treatment of infectious disease as well as in various food products, and this has led the researchers to make new studies. *Bacillus* species can show probiotic properties via their spores and metabolites (enzyme, antimicrobial substances etc.), and with these features, they attract the attention of researchers. Recently, several studies have been carried out related to evaluation of these species as probiotics and it is particularly investigated whether these bacteria are safe to use by human. In this study, behavior of *Bacillus* species in gastrointestinal tract, their mechanisms of action as probiotics, and their possibilities of usage were reviewed.

**Keywords:** *Bacillus*, probiotic, gastrointestinal system

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ certel@akdeniz.edu.tr, ☎ (+90) 242 310 6677, 📠 (+90) 242 310 15 61

## GİRİŞ

Probiyotik terimi, "yaşam için" anlamına gelmekte ve özellikle son zamanlarda insan ve hayvanlara yararlı etkiler sağlayan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Probiyotikler için 1960'lı yıllardan bu yana çeşitli tanımlar yapılmış olmakla birlikte yasal ve genel geçer bir tanım henüz mevcut değildir. Ancak Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) uzmanlarının yaptığı "yeterli miktarda alındığı zaman sağlığa yararlı etki sağlayan canlı mikroorganizmalardır" şeklindeki mevcut son tanım çoğunlukla kabul görmektedir (1, 2).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için bağırsaklarda kolonize olması, midenin asitli ortamını geçerek canlı kalması, safra asitlerine dayanıklı olması, canlılığını ve metabolik aktivitesini bağırsaklarda da devam ettirmesi, patojen ve toksik olmaması, konakçıya fayda sağlaması gerekmektedir (3, 4). Probiyotiklerin ürünlerde en az  $10^6$ - $10^7$  kob/g düzeyinde bulunması gerektiği, bununla birlikte bazı türlerin  $10^7$ - $10^8$  kob/g düzeyinde aktif, bazı türlerin ise  $10^6$  kob/g gibi daha düşük miktarlarda etkili olabildiği belirtilmektedir (5, 6).

İnsanların ve hayvanların gastrointestinal sistem (GİS)'inde karışık halde bulunan yararlı ve potansiyel zararlı bakterilerin, normal şartlarda belirli bir denge içinde olması gerekmektedir. Ancak hastalık, stres, yetersiz beslenme ve diğer birçok faktörün etkisiyle bu denge olumsuz yönde etkilenmektedir (7). Bu gibi durumlarda antibiyotik kullanımı mümkün olsa da antibiyotiklerin, potansiyel zararlı bakterilerin yanı sıra epitel hücre hasarlarına karşı koruma sağlayan, konakçının yağ depolanmasını düzenleyen ve bağırsak damar gelişimini (anjyogenez) uyaran yararlı bakterileri de gelişigüzel inhibe etmesi nedeniyle olumsuz etkileri söz konusudur (7, 8). Antibiyotiklere alternatif olarak bağırsaklardaki mikrobiyal dengeyi düzenleyerek konakçıya yararlı etki sağlayan probiyotikler, büyük ilgi uyandırmaktadır (9). Probiyotik mikroorganizmaların faydaları ya enfeksiyonların sürelerini kısaltma ya da patojenlere karşı duyarlılığı azaltma şeklinde olmaktadır. Yararlı etkinin oluşum mekanizması ise bağırsak florasının modifiye edilmesi, mukus veya epitel yüzeylere tutunma, bağırsaklardaki epitel bariyeri kuvvetlendirme ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi şeklindedir (10).

Probiyotikler, ilaç olarak kullanıma sunulabileceği gibi üretiminde kullanıldığı gıdalarla da alınabilmektedir. Gıdaların üretiminde en fazla kullanılan probiyotikler *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleridir. Bu türlere göre daha az

bilinmekle birlikte *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Escherichia* ve spor oluşturan *Sporolactobacillus*, *Brevibacillus* ve *Bacillus* cinsi bakterilerden de probiyotik olarak yararlanılabilmektedir. Ancak *Bacillus cereus* gibi enterotoksin üreten türlerin varlığı, bunların probiyotik olarak kullanımında güvenlik konularını gündeme getirmektedir. Dolayısıyla bu bakterilerin probiyotik olarak kullanımı için katı standartların geliştirilmesi gerekmektedir (11, 12).

## **Bacillus Türlerinin Probiyotik Olarak Kullanılması ve Gastrointestinal Sistemdeki Davranışı**

*Bacillus* türleri Gram pozitif, aerobik, çubuk şeklinde ve endospor oluşturan canlılardır (13). *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmeleri, özellikle oluşturdıkları spordardan kaynaklanmaktadır. Spor oluşumunu tetikleyen en önemli faktör ise besin yetersizliğidir. Ortamda besin olarak karbon, azot veya bazı durumlarda fosfor kaynağı olmadığı zaman *Bacillus* türlerinin büyüyen hücreleri sporlaşmaktadır (14). Spor oluşumu ayrıca aşırı yüksek ya da düşük sıcaklıklar ile mineral madde, tuz ve şeker gibi hipertonic ortam koşullarında da gerçekleşebilmektedir. Sporlar dormant (hareketsiz) halde olup ısı, radyasyon, kurutma, ekstrem pH koşulları ve toksik kimyasallara karşı dayanıklılık göstermektedir (15).

*Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* gibi probiyotik bakteriler, midenin yüksek asitli ortamı ve safra tuzları gibi normal fizyolojik koşullara karşı oldukça duyarlı olup bunların söz konusu koşullarda canlı kalma oranları %20-40 kadardır (16). Ayrıca bu bakterilerin canlılıkları üretim metodu ile taşıma ve depolama koşullarından da etkilenmektedir (17).

Probiyotik bakterilerin ürün içinde canlılığını sürdürmesini birçok faktör etkileyebilmektedir. Bu faktörler arasında probiyotik bakteri türü, ortamın pH'sı, hidrojen peroksit ve çözülmüş oksijen varlığı, laktik asit ve asetik asit gibi metabolitlerin konsantrasyonu, aşılama miktarı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile depolama koşulları yer almaktadır (18). Söz konusu faktörlere bağlı olarak probiyotik bakterilerin canlılığı ve aktivitesindeki azalma, çeşitli uygulamalarla önlenmeye ya da en aza indirilmeye çalışılmaktadır. Bu uygulamalar arasında gıdalarda kullanılmak üzere asit ve tuza dayanıklı suşların seçimi, oksijen geçirgenliği olmayan ya da düşük oksijen geçirgenliği olan ambalaj kullanımı (plastik ambalaj yerine cam ambalaj kullanımı gibi), iki basamaklı fermantasyon uygulanması, probiyotik kullanımı ve askorbik

asit ilavesi yer almaktadır (19). Ayrıca son yıllarda probiyotik mikroorganizmaların canlılığını geliştirmek üzere yapılan araştırmalar mikroenkapsülasyon uygulaması ve bakterilerin stres koşullarına karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesi gibi konular üzerine yoğunlaşmıştır (20). Buna karşın *Bacillus* sporları ise ilave bir işleme gerek duymadan, dayanıklılıkları sayesinde yüksek asitli mide ortamında ve safra tuzları varlığında canlılıklarını sürdürebilmekte, yaşama yeteneklerinde istenmeyen bir değişiklik olmadan oda sıcaklığında depolanabilmektedir (21).

*Bacillus* türleri yaklaşık 50 yıldır tıbbi destek ürünü adı altında kullanılıyor olmasına rağmen, bu konudaki bilimsel çalışmalar yaklaşık son 15 yıldır yapılmaktadır. Üzerinde en çok çalışılan *Bacillus* türleri; *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus* türleri çoğunlukla güvenilirdir; ancak bulaşıcı antibiyotik direnç etkenini barındıran suşlar ile enterotoksin ve/veya emetik toksin üretebilen suşlar sorun oluşturabilmektedir (21, 22).

Evrensel bir sınıflandırma olmasa da probiyotik bakteriler, GİS'in normal florasında bulunan ve bulunmayanlar olmak üzere iki sınıf olarak kabul edilebilmektedir (23). Ancak probiyotik bir bakterinin, insan orijinli olması ve hatta bağırsakların normal florasında bulunmasının daha uygun olabileceği yönündeki görüşler söz konusudur (24, 25).

*Bacillus* türü bakterilerin probiyotik olarak değerlendirilmeleri ile ilgili bazı soru işaretleri bulunmaktadır. Öncelikle, bu bakteriler toprak kökenli olup GİS'in normal florasında bulunmamaktadır. Bu açıdan bakıldığında; doğal olarak bağırsak florasında olmayıp, sadece geçici bir süre için bulunabilen ve ayrıca aralarında patojenlerin de bulunduğu *Bacillus* türlerinin nasıl yararlı etki sağlayabileceği, daha da önemlisi güvenli olup olmayacağı endişesi ortaya çıkmaktadır (22, 23). Ancak son dönemlerde yapılan bazı çalışmalarda *Bacillus* türlerinin sadece toprak kökenli olmadığı ve sporları aracılığıyla birçok ortamda canlılığını sürdürebileceği gösterilmiş, sindirim yoluyla *Bacillus* sporlarını alan hayvanların GİS'inde bu bakterilerin canlılığını sürdürebiliyor olması nedeniyle *Bacillus*'ların şu ana kadar keşfedilmemiş GİS komensali olabileceği öne sürülmüştür. Hatta bu çalışmalarda toprak kökenli olarak bilinen *Bacillus* türlerine ait sporların sanılanın aksine, toprağa gayta aracılığı ile bulaşıp toprakta akümüle olması sonucu miktarda artmasının mümkün olup olmayacağı konusu gündeme getirilmiştir (26, 27).

*Bacillus* türleri ile ilgili bir diğer soru aerob ya da fakültatif aerob olan bir bakterinin intestinal sistemde oksijensiz koşullarda nasıl canlı kalabildiği ve çoğalabildiğidir. Ancak bu konuyu açıklayabilir nitelikte bir takım çalışmalar mevcuttur. GİS, özellikle de ince bağırsaklar tam anlamıyla oksijensiz sayılmamaktadır. *Helicobacter* ve *Campylobacter* gibi bazı mikroaerofilik bakterilerin GİS'de kolaylıkla gelişebilmesi ortamda az da olsa oksijenin varlığına işaret etmektedir (23). Hong vd'nin (23) bildirdiğine göre; *B. subtilis*'in aerobik suşlarının elektron alıcısı olarak nitrat ve nitriti kullanarak veya elektron alıcısı olmadığı durumda fermantasyon ile anaerobik olarak gelişebileceği tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Clements vd (28) de *B. subtilis*'in nitrat solunumu ve/veya fermantasyon ile düşük oksijenli ortamda canlılığını sürdürebileceğini belirlemişlerdir.

Sporlu bakterilerle ilgili karışıklığa sebep olan ve en çok merak uyandıran soru ise probiyotik etkinin sporlar aracılığıyla mı sağlandığı yoksa sporların GİS'de vejetatif hale geçip canlı bir bakteri gibi davranarak çoğalması suretiyle mi gerçekleştiğidir (23).

*Bacillus* türlerinin hangi biyolojik formunun probiyotik etki sağladığını belirlemek için yapılan bir çalışmada; farelere patojen olmayan *Bacillus* türleri (*B. subtilis* ve *B. clausii*) oral olarak verilmiş, spor ve vejetatif hücreler test edilmiştir. Bağırsaklardan alınan örneklerde tespit edilebilir miktarda vejetatif hücre bulunamamış, bunun nedeninin de safra tuzundaki taurodeoksikolik asidin *Bacillus* türleri için toksik etki göstermesi olabileceği ileri sürülmüştür. Vejetatif hücrelere sadece lenf bezlerinde ve yalnızca bir farenin dalağında rastlanmış, sonuç olarak probiyotik etkiyi sporların ya da bağırsak dışında büyüyen vejetatif hücrelerin gösterebileceği belirtilmiştir (29). Buna karşın başka bir çalışmada, *B. subtilis* sporlarının farelerin ince bağırsağında (jejunum ve ileum bölgelerinde) önemli miktarda vejetatif hale geçtiği, ince bağırsakta kısa bir süre de olsa kolonize olabildiği ve probiyotik etki gösterdiği tespit edilmiştir (30).

Tavuklarla yapılan başka bir çalışmada da sporların sadece ince bağırsakta değil, GİS boyunca vejetatif hale geçebildiği belirlenmiştir (31). Jadamus vd (32) broiler (etlik piliç) ve domuzlarda yaptıkları çalışmada oral olarak alınan probiyotik *B. cereus* var. *toyo*'nin intestinal sistemde kolonize olamadığını; ancak hızlıca vejetatif hale geçebildiğini belirlemişler, bunun probiyotik etki göstermek için bir ön koşul olduğunu öne sürerek probiyotik olan suşun her iki hayvanın bağırsağında da metabolik olarak

aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Domuzlarda yapılan başka bir çalışmada ise *B. subtilis* ve *B. licheniformis* sporlarının GİS'de vejetatif hale geçebildiği; ancak geçici bir süre için kolonize olabildiği saptanmıştır. Bunun yanısıra probiyotik etki göstermek için çimlenmenin bir ön koşul olmadığı, bu etkinin sporlar aracılığı ile de sağlanabileceği belirtilmiştir (33).

Farelere oral olarak *B. subtilis* sporlarının verildiği bir çalışmada; farelerin dışkılarındaki spor sayısının, farelere orijinal olarak verilen spor sayısından daha fazla olmasının ancak sporların intestinal sistemde vejetatif hale geçip çoğaldıktan sonra tekrar sporlaşması ile açıklanabileceği ileri sürülmüştür. Sporların mukozal yüzeylere yayılmadığı tespit edilmiş; fakat probiyotik etkinin vejetatif hücreden mi yoksa spordan mı kaynaklandığı konusunda net bir açıklama getirilememiştir (34). Tam vd (35) moleküler bir metot kullanarak, oral olarak alınan *B. subtilis* sporlarının GİS'de vejetatif hale geçip çoğaldıktan sonra tekrar sporlaştığını tespit etmişler; bu durumda, *B. subtilis*'in doğal yaşam döngüsünün bir parçası olarak intestinal ortama adapte olduğunun bir kanıtı olabileceğini ve yakın ilişkili diğer *Bacillus* türlerinin de benzer etki gösterebileceğini öne sürmüşlerdir.

Sağlıklı insanların GİS'inden izole edilen bazı *Bacillus* türlerinin karakterizasyonunun yapıldığı çalışmalarda, bu türlerin intestinal ortama iyi adapte oldukları ve canlılıklarını koruyabildikleri, GİS'de kolonize olabildikleri ve insanlar için probiyotik suş olarak kullanılacakları belirtilmiştir (27, 36).

Ortamda besin maddelerinin bulunması, çimlenmeyi tetikleyen birincil faktördür. İnce bağırsağın üst kısımlarının da besin maddelerince zengin olması, sindirim yolu ile alınan sporların GİS'de özellikle de ince bağırsakta çimlenebilmesini açıklayabilir niteliktedir (35). Bunun yanısıra düşük pH da, bazı *Bacillus* türlerinde çimlenme prosesinin aktive olmasına yardımcı olmaktadır (37). Ayrıca ortamda az da olsa oksijen olması, çimlenen hücrenin çoğalmasına da olanak sağlamaktadır (23).

### ***Bacillus* Türlerinin Probiyotik Etki Sağlama Mekanizması**

*Bacillus* türlerinin intestinal sistemde probiyotik etki göstermesine vejetatif hücrelerin mi yoksa sporların mı aracılık ettiği tam olarak anlaşılamamıştır; ancak her iki biyolojik formun ayrı ayrı ya da birlikte etkili olabileceğini gösterir yönde çalışmalar mevcuttur. *Bacillus* türleri probiyotik etkiyi temel olarak, metabolik aktiviteleri sonucu salgıladıkları biyoaktif bileşikler aracılığıyla ve bağışıklık sistemini uyarma yoluyla göstermektedir (11).

Probiyotik mikroorganizmaların GİS'deki patojen mikroorganizmaları engellemedeki birincil mekanizmasının antimikrobiyal madde üretimi olduğu düşünülmektedir (23). *Bacillus* türlerinin 45'den fazla antimikrobiyal madde ürettiği bildirilmiştir. Bunların bir kısmı klinik önem taşırken; bir kısmı gıdaların üretiminde, bir kısmı da bitki hastalıklarının kontrol edilmesinde kullanılmaktadır. Bu antimikrobiyal maddeler; ribozomal olarak sentezlenen, protein yapısındaki bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri maddeler ile enzimatik olarak sentezlenen küçük peptidler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (38). *Bacillus* türlerinin ürettiği bakteriyosinler, Gram pozitif ve negatif bakterilerden maya ve küflere kadar geniş bir inhibisyon alanına sahiptir. *Clostridium perfringens* ve *Clostridium difficile* gibi intestinal patojenlere karşı inhibitif aktivite göstermeleri nedeniyle bakteriyosin üreten *Bacillus* türlerinin, insanlar için probiyotik olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (39). *Bacillus polyfermenticus*'un ise polyfermentacin SCD olarak adlandırılan bir bakteriyosin ürettiği ve uzun süreli intestinal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan ticari bir probiyotik olduğu belirtilmiştir (40). *B. coagulans* tarafından üretilen ve bakteriyosin benzeri madde olan koagulinin; *Enterococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc* gibi Gram pozitif bazı patojenlere, *B. clausii*'nin ürettiği antimikrobiyal maddelerin de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* ve *C. difficile*'e karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. (41, 42) Ancak konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar çoğunlukla in vitro denemelere dayandığından, bunların GİS'de de aynı etkiyi gösterip gösteremeyecekleri ayrı bir araştırma konusudur.

*Bacillus* türleri, antimikrobiyal maddelerin yanı sıra salgıladıkları vitamin ve enzimler aracılığı ile de yararlı etki sağlayabilmektedir (11). Hosoi vd (43) *in vitro* olarak yürüttükleri bir çalışmada *B. subtilis* (natto) suşunun, muhtemelen ürettiği katalaz ve subtilisin aracılığıyla, *Lactobacillus* türlerinin gelişimini ve/veya canlılığını artırdığını tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise subtilisin enziminin soya ve ürünlerinde bulunan alerjen maddeyi parçaladığı, "natto" gibi *Bacillus* fermantasyonu ile üretilen soya ürünlerinde bu maddenin bulunmadığı tespit edilmiştir (44). *B. subtilis* tarafından salgılanan K2 vitamininin de insanlarda kan ve kemik mekanizması üzerine önemli etkileri olduğu belirtilmiştir (45).

Bağışıklık sistemini düzenleme, probiyotik etki açısından önemli mekanizmalardan biridir. Biyoaktif maddeler, vejetatif hücre tarafından salgılanabilirken, bağışıklık sisteminin uyarılmasını sporların sağladığı

düşünülmektedir (33). Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada *B. subtilis* ve *Bacteroides fragilis* kombinasyonunun, sindirimin bağımsızlık sistemi olarak bilinen, gut-ilişkili lenfoid dokuların (GALT) geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığı ve GALT gelişimi için sporlaşmanın elzem olduğu belirlenmiştir (46). Severson (47) *Bacillus* türlerine ait sporların bağımsızlık sistemi hücresi olan B hücrelerinin çoğalmasını ve folikül oluşumunu uyarma yolu ile GALT'ın gelişimine katkıda bulunabileceğini belirtmiştir.

Jensen vd (48) *in vitro* olarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada, probiyotik özellik gösteren *B. coagulans*'ı içeren GanedenBC30™'u kullanmış ve GanedenBC30™ tüketiminin, bağımsızlık sistemini düzenlediğini ve anti-enflamatuvar etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir.

### **Bacillus Türlerinin Güvenilirliği ve Probiyotik Olarak Kullanımdan Önce Yapılması Gerekenler**

FAO/WHO uzmanlar grubunun raporuna göre probiyotik mikroorganizmaların değerlendirilmesinde şu hususlar dikkate alınmalıdır:

-Probiyotik özellikler türe özgü olduğundan, seçilen suş biyokimyasal testler ve moleküler metotlarla cins ve tür bazında tanılanmalıdır.

-*In vitro* çalışmalarla suşun güvenilir olduğu ve virulans faktörü taşımadığı tespit edilmelidir.

-Suşun antimikrobiyal aktivitesi, antimikrobiyal direnç profili, sonradan kazanılmış direnç geni taşımadığı, direnç genini transfer etmediği ortaya konulmalıdır.

-Suşun hangi açıdan sağlığa yararlı etki sağladığı tanımlanmalıdır.

-Önce hayvan daha sonra da insan denemeleri ile suşun güvenilirliği ve etkisi test edilmelidir (1, 23).

*Bacillus* türleri arasında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından genel olarak güvenilir olduğu kabul edilen (GRAS) suşlar (*B. subtilis* ve *B. licheniformis*) olduğu gibi patojen (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides* ve *B. weihenstephanesis*) olan suşlar da mevcuttur (49, 50). *B. cereus*'un enterotoksin ve emetik toksin olmak üzere iki farklı toksin üreterek gıda zehirlenmelerine neden olduğu bilinmektedir (51, 52). Ancak *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. fusiformis* ve *B. licheniformis* gibi türlerin de toksin üretebildiği belirlenmiştir (53, 54). Dolayısıyla probiyotik olarak değerlendirilecek suşların çok iyi tanılanıp karakterize edilmesi gerekmektedir. Nitekim Duc vd (55) *Bacillus* sporlarını içeren 5 adet ticari probiyotik ürünün (ürünlerden biri *B. calusii*, diğeri *B. pumilus* içerirken, son üç

üründe farklı *B. cereus* suşları bulunmaktadır) karakterizasyonunu yapmış, mikroorganizmaların potansiyel probiyotik etkisi olduğunu; ancak her üç *B. cereus* suşunun da enterotoksin ürettiğini belirlemişlerdir. Green vd (56) ise *B. subtilis* probiyotik preparatı olarak satılan iki ticari üründe yaptıkları fizyolojik ve genetik karakterizasyon sonucu, her iki ürünün de aslında *B. subtilis* içermediğini tespit etmişlerdir. Hoa vd (57) de *Bacillus* türlerini içeren beş farklı ticari probiyotik ürünü incelemiş, bunların dört tanesinin belirtilenden farklı bir *Bacillus* türünü içerdiğini ve yine dört üründeki bakterilerin de yüksek düzeyde antibiyotik direnci gösterdiğini saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise ticari bir probiyotik üründeki *B. subtilis* ve *B. licheniformis* türleri incelenmiş, her iki türün de antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu, toksin üretmediği; *B. subtilis*'in patojen olmadığı ve insanların kullanımı için uygun olduğu, ancak *B. licheniformis*'in antibiyotik direnci ile ilgili bazı risk faktörlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (22).

### **Bacillus Türlerine Ait Sporların Besin Takviyesi/ Tıbbi Destek Ürünü Olarak ve Gıdalarda Kullanımı**

Probiyotik *Bacillus* türleri genellikle; insanlar için besin takviyesi, hayvanlar için büyümeyi teşvik edici, su ürünleri için ise büyüme düzenleyici veya hastalıklara karşı direnç sağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ile Avrupa ve Asya ülkelerinde üretilip satışı yapılan probiyotik *Bacillus* ürünlerinin üretici firmaları ve bu ürünlerin içerdikleri bakteri türü ve taşıdıkları spor yükleri Hong vd (23) ve Cutting (21) tarafından tablolar halinde sunulmuştur. Ürünlerin çoğunun satışı internet üzerinden yapılmakta olup konu ile ilgili çalışmalarda birçok üründeki bakteri türünün etikette belirtilenden farklı olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Türkiye'de de hayvan beslemesinde kullanım için internet siteleri üzerinden çeşitli ürünler satışa sunulmuştur. Ancak insan kullanımına yönelik *Bacillus* türü bakteri içeren sadece bir probiyotik ürüne rastlanmıştır. Probiyotik beslenme takviyesi olarak ifade edilen *B. coagulans* (GanedenBC30™) içeren Sustenex® isimli ürün ile ilgili olarak internet sitelerinde benzer bilgilere yer verilmiştir. Fakat incelenen siteler arasından yalnızca birinde ürünün, eski adıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın izni ile ABD'den ithal edildiği ve en az 2x10<sup>9</sup>adet/ kapsül *B. coagulans* hücresi içerdiği bildirilmiştir (58). Endres vd (17) yaptıkları toksikolojik çalışmalarla GanedenBC30™'un mutajenik, klastojenik ve genotoksik etki göstermediğini; insanların tüketimi için güvenilir kabul edilebileceğini tespit etmişlerdir.

Ayrıca, ısıtma işlemine dayanıklı olduğundan, GanedenBC30™'un 2008 yılında ABD'de bir kek çeşidi olan muffine de ilave edildiği bildirilmiştir (21).

*Bacillus* türlerinin karotenoid de üretebildiği belirlenmiştir. Karotenoidlerin besinsel değeri bulunmakla birlikte bunlar antioksidan aktivite de göstermektedir. Ancak bunlar sindirim sırasında midede kolayca parçalanabilmektedir. *Bacillus* türleri sporları aracılığıyla mide koşullarına dayanabildiklerinden ürettikleri karotenoidlerin de korunabileceği, dolayısıyla bu türlere ait sporların besin takviyesi olarak kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca karotenoidlerin sporları UV ışınlarına karşı korudukları tespit edilmiştir (21, 59).

Hong vd (50) *B. subtilis* ve *B. indicus*'un gıda katkısı olarak kullanılabilirliğini ifade etmişler, *in vivo* deneylerle her iki bakterinin de toksik olmadığını ve virulans faktörü taşımadığını belirtmişler; ancak bu bakterilerin, klindamisine karşı olan dirençleri ile ilgili detaylı araştırma yapılması gerektiğini savunmuşlardır. Patel vd (12) de inceledikleri *Bacillus* türleri arasında potansiyel probiyotik olarak kullanıma en uygun suşun *B. subtilis* olduğunu saptamışlardır. Sreekumar ve Krishnan (60) süt sanayi atık sularından izole ettikleri *B. subtilis* SK09 suşunu karakterize etmiş ve suşun oda sıcaklığında laktozu fermente etme yeteneğine dayanarak, laktoz intolerans rahatsızlığı olanlar için probiyotik katkı olarak kullanılabilirliğini öne sürmüşlerdir.

Japonya'ya özgü geleneksel bir ürün olan, *B. subtilis* (natto) kullanılarak, soya fasulyesinin fermantasyonu ile üretilen Natto'nun potansiyel probiyotik etkileri olduğu, bakterinin tek başına tüketilmesinden soya ve bakterinin birlikte tüketilmesi ile daha fazla yarar sağlandığı bildirilmiştir (21, 61).

Konu ile ilgili yapılan farklı bir çalışmada, GIS'de olumlu etkileri olduğu belirlenen bir *B. subtilis* suşuna ait sporlar tam buğday bisküvisi üretiminde kullanılmış, 235 °C'de 8 dakika ısıtma işlemi sonunda spor sayısında sadece 1-log azalma olduğu saptanmış, dolayısıyla bu suşa ait sporların çeşitli gıda ürünlerinde probiyotik katkı olarak kullanılmasının mümkün olabileceği belirtilmiştir (62).

## SONUÇ

Tüketicilerin sağlık bilincinin artması ile birlikte probiyotik ürünlere olan ilgi ve buna paralel olarak probiyotik ürünlerle ilgili yapılan bilimsel çalışmalar da artmaktadır. Probiyotik olarak üzerinde en çok çalışılan mikroorganizmalar

*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleridir. Bununla birlikte probiyotik olarak *Bacillus* gibi spor oluşturan bakterileri içeren ve ticari olarak satılan ürünler olduğu halde, bu konudaki bilimsel çalışmalar yaklaşık son on beş yıldır yapılmakta olup henüz bu konu ile ilgili aydınlatılmamış hususlar mevcuttur. Bu nedenle *Bacillus* türlerinin potansiyel probiyotik olarak insanların tüketimine sunulacak ürünlerde kullanılabilmesi için detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Anonymous 2006. FAO/WHO. Probiotics in Food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
2. Makinen K, Berger B, Bel-Rhliid R, Ananta E. 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J Biotechnol*, 162 (4):356-365.
3. Cruz AG, Faria JAF, Van Dender AGF. 2007. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res Int*, 40: 951-956.
4. Singh K, Kallali B, Kumar A, Thaker V. 2011. Probiotics: A review. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1 (2): S287-S290.
5. Shortt C. 1999. The probiotic century: Historical and current perspectives. *Trends Food Sci Technol*, 10: 411-417
6. Kılıç S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, İzmir, Türkiye, 451 s.
7. Elahi S, Farnell P, Thurlow KJ, Scotti C, Varnam AH. 2008. Referee analysis of probiotic food supplements. *Food Control*, 19: 925-929.
8. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308: 1635-1638.
9. Kavas ST. 2007. Probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistem uyumluluğu ve enterik patojenlere etkisi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi, Denizli, Türkiye, 59 s.
10. Desphande G, Rao S, Patole S. 2011. Progress in the field of probiotics: year 2011. *Curr Opin Gastroen*, 27: 13-18.
11. Sanders ME, Morelli L, Tompkins TA. 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Compr Rev Food Sci*, F 2: 101-110.

12. Patel AK, Ahire JJ, Pawar SP, Chaudhari BL, Chincholkar SB. 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *Food Res Int*, 42: 505-510.
13. Logan NA, Berkeley RCW. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J Gen Microbiol*, 130: 1871-1882.
14. Piggot PJ, Hilbert DW. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, 7: 579-586.
15. Setlow P. 2003. Spore germination. *Curr Opin Microbiol*, 6: 550-556.
16. Bezkorovainy A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr*, 73: 399S-405S.
17. Endres JR, Clewell A, Jade KA, Farber T, Hauswirth J, Schauss AG. 2009. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food Chem Toxicol*, 47: 1231-1238.
18. Donkor ON, Henriksson A, Vasilyevic T, Shah, NP. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt. *Int Dairy J*, 16: 1181-1189.
19. Şener A. 2009. Serbest ve mikroenkapsüle probiyotik bakterilerin ticari dondurma üretiminde kullanılabilirliği üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 156 ss, Ankara.
20. Sanders ME, Marco ML. 2010. Food formats for effective delivery of probiotics. *Annu Rev Food Sci Technol*, 1: 65-85.
21. Cutting SM. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol*, 28: 214-220.
22. Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC. 2008. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Digest Dis Sci*, 53: 954-963.
23. Hong HA, Duc LH, Cutting SM. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 29: 813-835.
24. Lee YK, Salminen S. 1995. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci Technol*, 6: 241-245.
25. Saarela M, Mogensen G, Fonde'n R, Matto J, Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*, 84: 197-215.
26. Hong HA, To E, Fakhry S, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Res Microbiol*, 160: 375-379.
27. Hong HA, Khaneja R, Tam NMK, Cazzato A, Tan S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM. 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res Microbiol*, 160: 134-143.
28. Clements LD, Streips UN, Miller BS. 2002. Differential proteomic analysis of *Bacillus subtilis* nitrate respiration and fermentation in defined medium. *Proteomics*, 2: 1724-1734.
29. Spinosa MR, Braccini TB, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, Oggioni MR. 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol*, 151: 361-368.
30. Casula G, Cutting SM. 2002. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microb*, 68 (5): 2344-2352.
31. Cartman ST, La Ragione RM, Woodward MJ. 2008. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. *Appl Environ Microb*, 74 (16): 5254-5258.
32. Jadamus A, Vahjen W, Simon O. 2001. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch Anim Nutr*, 54: 1-17.
33. Leser TD, Knarreborg A, Worm J. 2007. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J Appl Microbiol*, 104: 1025-1033.
34. Hoa TT, Duc LH, Istatico R, Baccigalupi L, Ricca E, Van PH, Cutting SM. 2001. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. *Appl Environ Microb*, 67 (9): 3819-3823.
35. Tam NKM, Uyen NQ, Hong HA, Duc LH, Hoa TT, Serra CR, Henriques AO, Cutting SM. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol*, 188 (7): 2692-2700.
36. Fakhry S, Sorrentini I, Ricca E, De Felice M, Baccigalupi L. 2008. Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*, 105: 2178-2186.
37. Faille C, Membre J, Kubaczka M, Gavini F. 2002. Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation. *J Food Protect*, 65: 1930-1936.
38. Baruzzi F, Quintieri L, Morea M, Caputo L. 2011. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Méndez-Vilas A (ed), Volume 1, FORMATEX Microbiology Series No 3, Spain, pp. 1102-1111.
39. Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, Galvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev*, 35: 201-232.

40. Lee KH, Jun KD, Kim WS, Paik HD. 2001. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett Appl Microbiol*, 32: 146-151.
41. Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci MC. 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14. *J Appl Microbiol*, 85: 42-50.
42. Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I. 2004. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol*, 38 (6): 86-90.
43. Hosoi T, Ametani A, Kiuchi K, Kaminogawa S. 2000. Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin. *Can J Microbiol*, 46 (10): 892-897.
44. Bando N, Tsuji H, Hiemori M, Yoshizumi K, Yamanishi R, Kimoto M, Ogawa T. 1998. Quantitative analysis of Gly m Bd 28K in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 44 (5): 655-664.
45. Sato T, Yamada Y, Ohtani Y, Mitsui N, Murasawa H, Araki S. 2001. Production of menaquinone (vitamin K<sub>2</sub>)-7 by *Bacillus subtilis*. *J Biosci Bioeng*, 91 (1): 16-20.
46. Rhee KJ, Sethupathi P, Driks A, Lanning DK, Knight KL. 2004. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J Immunol*, 172 (2): 1118-1124.
47. Severson KM. 2011. Bacterial stimulation of gut-associated lymphoid tissue development. ProQuest, UMI Dissertation Publishing, USA, 376 p.
48. Jensen GS, Beson KF, Carter SG, Endres JR. 2010. GandednBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects *in vitro*. *BMC Immunology*, 11 (15): 1-14.
49. Schallmeyer M, Singh A, Ward OW. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol*, 50: 1-17.
50. Hong HA, Huang JM, Khaneja R, Hiep LV, Urdaci MC, Cutting SM. 2008. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J Appl Microbiol*, 105: 510-520.
51. Granum PE. 2003. Food Poisoning. In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition, Caballero B, Trugo L, Finglas PM (ed), Elsevier Science, USA, pp 365-371.
52. Shugart LR. 2005. *Bacillus cereus*. In: Encyclopedia of Toxicology, Wexler P. (chief ed), Academic Press, UK, p 203.
53. Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, Kampfer P, Andersson MC, Honkanen-Buzalski T, Scoging AC. 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl Environ Microb*, 66 (10): 4637-4645.
54. From C, Pukall R, Schumann P, Hormazabal V, Granum PE. 2005. Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microb*, 71 (3): 1178-1183.
55. Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microb*, 70 (4): 2161-2171.
56. Green DH, Wakeley PR, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl Environ Microb*, 65 (9): 4288-4291.
57. Hoa NT, Baccigalupi L, Huxham A, Smertenko A, Van PH, Ammendola S, Ricca E, Cutting SM. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl Environ Microb*, 66 (12): 5241-5247.
58. Anonymous 2013. Sustenex. <http://www.cenova.com/sustenex.html> (Erişim tarihi 11.02.2013).
59. Khaneja R, Perez-Fons L, Fakhry S, Baccigalupi L, Steiger S, To E, Sandmann G, Dongs TC, Ricca E, Fraser PD, Cutting SM. 2010. Carotenoids found in *Bacillus*. *J Appl Microbiol*, 108: 1889-1902.
60. Sreekumar G, Krishnan S. 2010. Isolation and characterization of probiotic *Bacillus subtilis* SK09 from dairy effluent. *Indian J Sci Technol*, 3 (8): 863-866.
61. Hosoi T, Kiuchi K. 2008. Natto: A soybean food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). In: *Handbook of Fermented Functional Foods*. Farnworth ER. (chief ed), CRC Press, Boca Raton, pp. 267-290.
62. Permpoonpattana P, Hong HA, Khaneja R, Cutting SM. 2012. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. *Benef Microbes*, 3 (2): 127-135.