

Değişik Tuz Konsantrasyonlarında Bacillus Türlerinin Staphylococcus Aureus Türü Üzerine İnhibitör Etkilerinin Araştırılması

Güven Uraz*, Mine Kaanoğlu**, Lale Türkmen***

*Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Ankara

**Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Onkoloji Bölümü, Ankara

***Ankara Üniversitesi, Çankırı Sağlık Yüksekokulu, Çankırı

Araştırmamızda, 195 çiğ süt örneğinden toplam 33 Bacillus izole edilerek adlandırılmıştır. 13 Bacillus türünün aynı ortamda kontaminant olarak bulunan Staphylococcus aureus türü üzerine inhibitör etkileri kuyu diffüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. Bu amaçla BHI agar besiyerine %4, %4.5, %5, %5.5, %6 ve %6.5 konsantrasyonlarında NaCl ilave edilerek inhibitör etkileri kuyu diffüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda Bacillus türlerinden sadece Bacillus lentus-I ve Bacillus lentus-II izolatlarının Staphylococcus aureus türü üzerine inhibitör etkisi gözlenmiştir. Geriye kalan Bacillus türlerinin Staphylococcus aureus üzerine hiçbir inhibitör etkisi gözlenmemiştir. Bacillus lentus-I, Bacillus lentus-II izolatlarının Staphylococcus aureus türü üzerine %4, %4.5, %5 ve %5.5 NaCl Konsantrasyonlarında inhibitör etkilerinin olduğu gözlenmiştir. İnhibitör etki sonucunda oluşan inhibitasyon zon çaplarında giderek artış gösterdikleri tespit edilmiştir. Ancak %6 ve %6.5 NaCl konsantrasyonlarında inhibitör etki gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Bacillus, Staphylococcus aureus, NaCl, inhibitör etki.

The Investigation Of The Inhibitory Effects Of Bacillus (*Bacillus Lentus*) Species In The Variable Salt Concentrations Against *Staphylococcus Aureus*

Totally 33 *Bacillus* strains were isolated and named from 195 raw milk samples which were obtained from various milk companies. The inhibitory effects of 13 *Bacillus* strains against *Staphylococcus aureus* which was found to be contaminant in the same medium of *Bacillus* strains were studied by using well diffusion method in BHI Agar supplemented with %4, %4.5, %5, %5.5, %6 and %6.5 concentrations of NaCl. Result of this study revealed that only *Bacillus lentus-I* and *Bacillus lentus-II* were observed to make inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* in BHI medium added with %4, %4.5, %5 and %5.5 concentrations of NaCl. The inhibition zone diameters of *Bacillus* inhibitory effects were showed to increase in addition to salt concentration, gradually. But in %6 and %6.5 salt concentration, the inhibitory effects were not observed against *Staphylococcus aureus*.

Key Words: *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, NaCl, Inhibitory effects.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda çiğ süt florasında bulunan birçok bakterinin birbiriyle etkileşimi araştırılmıştır.^{1,2,3}

Bu düşünceden hareketle çalışmamızda, Bacillus türlerinin aynı florada bulunan Staphylococcus aureus üzerine inhibitör etki varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla değişik tuz konsantrasyonlarında Bacillus'ların S.aureus üzerine inhibitör etkilerinin ne oranda artabileceği test edilmiştir.

Gram(-) ve Gram(+), değişik bakteri türleri tarafından oluşturulan ve ayrı türlerin farklı suşlarına öldürücü veya inhibe edici etkisi olan maddelere bakteriyosin denir. Bakteriyosinler sentezlendikleri bakteri türlerine uygun olarak adlandırılırlar.⁴ Bakteriyosinler biyolojik aktiviteleri ile ilgili kimyasal testlerin yokluğunda, tüm çalışmalar antagonistik aktivitenin gösterilmesine dayanmaktadır. Antagonistik etkinin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en basit ve yaygın olarak kullanılan kuyu diffüzyon yöntemidir.⁴ İndikatör bakteri agara inoküle edilir. Agarda kuyu açılır. Açılan kuyuya test bakteri inoküle edilir. İnkübasyondan sonra kuyu etrafında oluşan inhibisyon zon çapı ölçülerek değerlendirilir.⁵

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızda, çeşitli bölgelerden sağlanan toplam 195 çiğ süt örneği çalışılmıştır. İncelenen örneklerden 33 Bacillus türü izole ve identifiye edilmiştir.

Çiğ sütlerden Bacillus izolasyonu amacıyla PCA (Plate Agar – Difco) ve Glukoz Agar (GA) besiyerleri kullanılmıştır. Bu işlemde, %0.1'lik pepton water ile sulandırılmaları yapılan örneklerin 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} oranlarında dilüsyonları hazırlanmıştır. 10^3 lük dilüsyondan 0.1 ml. alınarak PCA ve GA besiyerlerine ekilmişlerdir. Ekimi yapılan plaklar 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra üreyen şüpheli kolonilerden preparatlar hazırlanarak, Gram boyası ile boyanmışlardır. Sporlu basillerin yeniden saf suş olarak elde edilebilmesi için GA'ya pasajları yapılmıştır. Seri pasajlarla, bakteriler saf kültür haline getirilmiştir. Daha sonra bakterilerin yatık agara ekimleri yapılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de stok kültür olarak muhafaza edilmiştir. Kültürlerin aktivitelerini korumak amacıyla her 20 günde taze besiyerine pasajları sürdürülmüştür.

Bacillus'ların adlandırılmalarında çeşitli biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Katalaz testi, hareket (SIM), jelatin hidrolizi, triple sugar iron (TSI), sitrat, üre, indol, voges proskauer (VP), %6.5 NaCl'de üreme, nitrat, kanlı agarda hemoliz oluşturma ve glukoz, ksiloz, mannitol, laktoz, sükröz maltoz'u fermente etme özellikleri bu amaçla kullanılan testlerdir.⁶

Çalışmamızın amacı doğrultusunda Bacillus türlerinin, aktifleştirilen S.aureus üzerine değişik tuz konsantrasyonlarında inhibitör etkisi Agar Kuyu Diffüzyon Metodu ile araştırılmıştır.⁷ İndikatör suş, Bacillus'lar ise test suşu olarak çalışılmıştır.

Bu işlemde, S.aureus suşu BHI broth besiyerine ekilerek 37°C 'de 24 saat, test suşu olan Bacillus'lar Nutrient broth'a ekilerek 2 saat inkübe edilmişlerdir (1,7,8). Suşlar Agar Kuyu diffüzyon metodu için aktifleştirilmişlerdir. Bu metodda BHI agar besiyeri kullanılmıştır.⁷

BHI agar besiyerine %4, %4.5, %5, %5.5, %6 ve %6.5 oranlarında NaCl ilave edilerek 121°C 'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Nutrient broth'ta aktifleştirilen değişik oranlarda NaCl içeren besiyerlerine S.aureus suşları pipetlenerek plakalara paylaştırılmıştır. Besiyeri üzerinde 10 mm çapındaki cam tüplerle kuyular açılmıştır. Açılan kuyulara NaCl içermeyen agar damlatılmıştır. Damlatılan agar soğuduktan sonra kuyunun içerisine 50-100 ml Nutrient broth'da aktifleştirilmiş Bacillus suşları pipetlenmiştir. Daha sonra Bacillus türlerinin diffüze olması için plaklar iki saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37°C ve 24 saatte inkübasyona bırakılmışlardır.

Çalışmamız sonucunda 10 mm'lik kuyu çapı dikkate alınmaksızın kuyunun etrafında oluşan inhibisyon zon çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Kuyu etrafında inhibisyon zonu oluşmuşsa pozitif, kuyu etrafında inhibisyon zonu oluşmamışsa negatif olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Araştırmada, 195 çiğ süt örneğinin 28'inde Bacillus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bazı örneklerde birden fazla Bacillus türü izole edildiğinden toplam izolat sayısı 33 olarak saptanmıştır.

Tablo 1'de çiğ süt örneklerinden izole edilen Bacillus'ların türlere göre dağılımı ve izolasyon yüzdeleri gösterilmiştir. Tablo 2'de ise Bacillus türlerinin S.aureus türü üzerine BHI agar besiyerinde kuyu diffüzyon yöntemi ile inhibitör etki sonuçları değerlendirilmiştir. Buna göre BHI agara değişik oranlarda (%4, %4.5, %5, %5.5, %6 ve %6.5) ilave edilen NaCl konsantrasyonlarında B.lentus (B.lentus-I ve B.lentus-II)'nin S.aureus üzerine inhibitör etkileri gözlenirken, geriye kalan

Değişik Tuz Konsantrasyonlarında Bacillus Türlerinin Staphylococcus Aureus Türü Üzerine İnhibitör Etkilerinin Araştırılması

31 izolatın aynı ortamda hiçbir inhibitör etki oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 1: Çiğ süt örneklerinden izole edilen Bacillus'lann türlere göre dağılımı ve izolasyon yüzdeleri

İzole edilen Bacillus türleri	İzole edilen Bacillus sayısı	%
<i>Bacillus brevis</i>	3	%9
<i>Bacillus cereus</i>	3	%9
<i>Bacillus circulans</i>	2	%6
<i>Bacillus coagulans</i>	2	%6
<i>Bacillus lentus</i>	2	%6
<i>Bacillus licheniformis</i>	3	%9
<i>Bacillus macerans</i>	2	%6
<i>Bacillus megaterium</i>	1	%3
<i>Bacillus mycoides</i>	3	%9
<i>Bacillus polymxa</i>	3	%9
<i>Bacillus sphaericus</i>	3	%9
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	3	%9
<i>Bacillus subtilis</i>	3	%9
TOTAL	33	

Tablo 3'de B.lentus türünün S.aureus türü üzerine BHI agar besiyerinde kuyu diffüzyon yöntemi ile inhibitör etki sonuçları gösterilmiştir. Buna göre tuz ilave edilmemiş BHI agarda B.lentus'un S.aureus üzerine inhibitör etkisi saptanmamıştır. B.lentus-I ve B.lentus -II izolatlarının %4 NaCl konsantrasyonunda, S.aureus üzerine inhibitör etkileri sonucu oluşan zon çapları 2 mm, %5.5 NaCl konsantrasyonunda B.lentus-I izolatının zon çapı 7 mm aynı konsantrasyonda B.lentus-II izolatının zon çapı ise 6 mm olarak tespit edilmiştir. Tablo 3 incelendiğinde BHI agardaki tuz konsantrasyonu arttıkça B.lentus tarafından oluşturulan inhibisyon zon çapının %5.5 tuz konsantrasyonuna kadar arttığı bulunmuştur.

Şekil 1 incelendiğinde B.lentus türünün tuz ilave edilmemiş BHI agarda S.aureus üzerine inhibitör etki göstermediği, ancak %4, %4.5, %5 ve %5.5 NaCl konsantrasyonlarında inhibitör etkiye sahip olduğu görülmektedir. İnhibitör etki sonucunda oluşan inhibitör zon çaplarının artan tuz

konsantrasyonuna paralel artış gösterdiği, ancak tuz konsantrasyonlarının %6 ve %6.5 olduğunda inhibirö etkinin oluşmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 2.: Bacillus türlerinin Staphylococcus aureus türü üzerine BHI agar besiyerinde kuyu diffüzyon yöntemi ile inhibitör etki sonuçları

İzole edilen Bacillus türü	BHI agar	BHI agara ilave edilen tuz konsantrasyonu (%4, %4.5, %5, %5.5, %6 ve 6.5)
<i>B. brevis (I,II,III)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. cereus (I,II,III)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. circulans (I,II)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. coagulans (I,II)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. licheniformis (I,II,III)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. macerans (I,II)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. lentus (I,II)</i>	I(-)	I(+)
<i>B. megaterium</i>	I(-)	I(-)
<i>B. mycoides (I,II,III)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. polymxa (I,II,III)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. sphaericus (I,II,III)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. stearothermophilus (I,II,III)</i>	I(-)	I(-)
<i>B. subtilis (I,II,III)</i>	I(-)	I(-)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllardaki literatürlerde Bacillus türleri ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

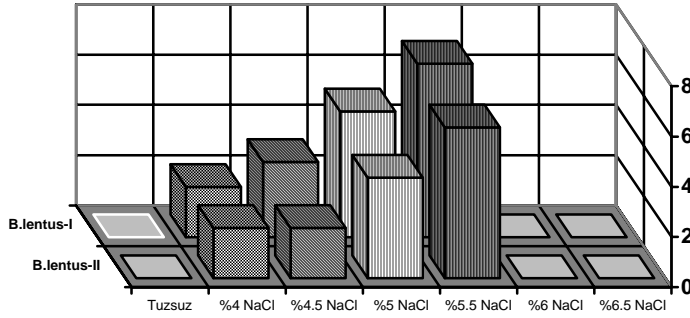
Collins ve arkadaşları, çalışmalarında bazı Bacillus türlerinin, bazı bakterilere karşı inhibitör etki gösteren madde salgıladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, inceledikleri Bacillus türlerinden B.subtilis'in subtilin, B.polymxa'nın polymxin ve B.brevis'in gramicidin adı verilen antibiyotikleri sentezlediklerini saptamışlardır.⁹ Araştırmamızda bu açıdan önem taşıyan B.subsitis, B.polymxa ve B.brevis izolatlarının S.aureus üzerine inhibitör etkisi gözlenmemiştir. Peter ve arkadaşları, araştırmalarında pH ve sıcaklık uygulanan Bacillus'lara değişik tuz konsantrasyonlarının etkisini incelemişlerdir.

Tablo 3: Bacillus lentus türünün Staphylococcus aureus türü üzerine BHI agar besiyerinde kuyu diffüzyon yöntemi ile inhibitör etki sonuçları (mm)

İzole edilen Bacillus türü	BHI agar	BHI agara ilave edilen tuz konsantrasyonu					
		%4	%4.5	%5	%5.5	%6	%6.5
<i>B. lentus-I</i>	Ü(+) I(-)	2 mm	3 mm	5 mm	7 mm	-	-
<i>B. lentus-II</i>	Ü(+) I(-)	2 mm	2 mm	4 mm	6 mm	-	-

- Ü (+) : Plakta üreme gözlenmiştir.
I (-) : Plakta inhibitör etki gözlenmemiştir.
(-) : Plakta üreme ve inhibitör etki gözlenmemiştir.
Kuyu çapı değerlendirme alınmamıştır.

Şekil 1. B. Lentus-I ve B. Lentus-II izolatlarının S.aureus indikatör suşu üzerine değişik tuz konsantrasyonları içeren BHI agarda inhibitör etki sonuçları



Bu çalışmada araştırmacılar, B.cereus'u değişik konsantrasyonlarda NaCl ile muamele etmişlerdir. Uygulanan tuz konsantrasyonlarında B.cereus'un hangi pH ve sıcaklıkta gelişebileceğini gözlemlemişlerdir. Buna göre B.cereus % 0.5 NaCl, pH:4.7 ve yüksek sıcaklıkta, aynı zamanda % 3 NaCl, pH:4.9 ve 40 °C 'de geliştirme gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar B.cereus'un % 5 NaCl, pH:5.5 ve 39 °C 'de daha az geliştiğini, % 7 NaCl konsantrasyonunda ise üremediğini tespit etmişlerdir.¹

Çalışmalarımızda B.cereus'un % 4.5 – 5.5 NaCl içeren BHI agarda çok az gelişim gösterdiği, % 6 ve % 6.5 tuz konsantrasyonlarında ise üremediği saptanmıştır. Araştırmacıların sonuçları bizim bulgularımızla paralel bulunmuştur.

Tablo 2 ve 3 incelendiğinde B.lentus-I ve B.lentus-II izolatlarının S.aureus üzerine % 4, %4.5, ve %5.5 NaCl konsantrasyonlarında inhibitör etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda inhibitör etki sonucunda oluşan zon çaplarında giderek artış gösterdikleri belirlenmiştir. %6 ve %6.5 NaCl konsantrasyonlarında ise inhibitör etki saptanmamıştır.

Jones ve arkadaşları çalışmalarında, methisilin dirençli S.aureus'un (EMRSA)-16 NaCl konsantrasyonlarına karşı toleranslarını araştırmışlardır. S.aureus (EMRSA)-16'nın NaCl MIC değeri %5.5 – 10.5 olarak tespit etmişlerdir. Çalışma da %7 ve %10 NaCl içeren broth'da

üreme üzerine tam bir inhibisyonun olduğu gözlenmiştir.³ Araştırmamızda B.lentus-I ve B.lentus-II'nin S.aureus üzerine %4, %4.5, %5, %5.5 NaCl konsantrasyonlarında inhibitör etkileri gözlenmiştir.

Araştırmacıların sonuçları bizim sonuçlarımızla paralel bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda, 13 farklı Bacillus türünden sadece B.lentus'un S.aureus üzerine inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Peter AC, Thomas LV, Winpenny JWT. Effects of salt concentration on bacterial growth on plates with gradients of pH and temperature. FEMS Microbiology Letters 1991; 21: 309-14.
2. Thomas LV, Winpenny JWT. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus. Appl Environ Microbiol 1996; 62 (6): 2006-12.
3. Jones EM, Bowker KE, Cooker R, Marshall RJ, Reeves DS, Macgowan AP. Salt tolerance of EMRSA-16 and its effect on the sensitivity of screening cultures. J Hosp Infect 1997; 35 (1): 59-62.
4. Tagg JR, Dajani AS, Wanna M. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriologic Review 1976; 40: 722-56.
5. Brock TD, Madigan MT, Martinko LM, Parker J. Bacteriocins. Biology of Microorganisms 7 th ed. 1994: 264-5.
6. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn CW. Bacillus species. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4 th ed. Philadelphia: Lippincott Company 1992: 469-78.
7. Lewus CB, Montville TJ. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Journal of Microbiological Methods 1991; 13: 145-50.
8. Reinheimer JA, Demkow MR, Candioti MC. Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures. The Australian Journal of Dairy Technology 1990: 5-9.
9. Collins CH, Lyne PM, Grande JM. Bacillus. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 6th ed. 1996: 329-32.

Yazışma Adresi

Doç. Dr. Güven URAZ

Gazi Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi, Ankara

Tel : 312 212 6030-2701

Fax : 312 212 2279