

Bacillus megaterium Kullanılarak Patulin'in Biyolojik Yolla Ölçümü

Doç. Dr. Sami ÖZÇELİK

Selçuk Üniv. Ziraat Fakültesi — KONYA

ÖZET

Bacillus megaterium DSM* 90'in, patuline karşı duyarlı ve biyolojik yolla kantitatif patulin ölçümünde kullanılabilecek bir test organizması olduğu bulunmuştur. Test için uygun inokulumun 24 saatlik kültürden % 1 oranında, inkübasyon sıcaklığının 37°C, süresinin 15 saat olması en iyi sonucu vermiştir. 1.5 — 147.0 µg patulin/disk değerlerine karşı, 6.0 — 36.1 mm/çap arasında inhibisyon zonları ölçülmüştür. Bu değerlere göre çizilen standart eğriden, patulin muhtevası bilinmeyen örneklerin oluşturdukları inhibisyon zonlarının büyüklüklerine göre, ihtiva ettikleri patulin miktarının kantitatif olarak ölçülebileceği görülmüştür.

ZUSAMMENFASSUNG

Biologische Patulinbestimmung durch die Anwendung von *Bacillus megaterium*

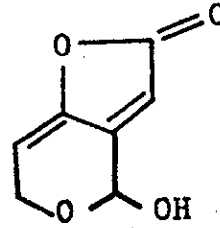
Es wurde festgestellt, dass der Stamm *Bacillus megaterium* DSM 90 gegen Patulin empfindlich ist und bei der biologischen Patulinbestimmung als ein Testorganismus verwendet werden kann. Es zeigte sich, dass die günstigen Inokulummenge von der 24 stündigen Kultur 1 %, die Inkubationstemperatur 37°C und die Inkubationsdauer 15 Stunden waren. Zwischen den Toxinmengen von 1.5 - 147.0 µg Patulin/Disk wurden die Hemmzonen in Größen von 6.0 - 36.1 mm/Durchmesser gebildet. Nach diesen Werten wurde die Eichkurve aufgezeichnet. Es stellte sich heraus, dass die Patulinmengen aus den Proben nach dieser Eichkurve quantitativ bestimmt werden können.

1. GİRİŞ

Gıdalarda ve yemlerde küf mantarlarının gelişmesi sonucu, insan ve hayvan sağlığına zararlı olan «mikotoksin» adı verilen küf zehirleri, bu ürünlere karışmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ve Food and Agricultural Organisation (FAO) tarafından gıda maddelerinde bulunabilecek mikotoksin miktarı, aflatok-

sin için 30 µg/kg olarak belirlenmiştir. Bu sınır değeri Amerika tarafından 20 µg/kg olarak verilmektedir (Frank, 1973). Gıdalardaki aflatoksin tolerans sınırlarının, çeşitli ülkelerde 30 - 50 µg/kg değerleri arasında olduğu belirtilmektedir (Krogh, 1977). Patulin ve diğer bütün mikotoksinler için de, sınır değerini yukarıda belirtilen miktarlarda olması istenmektedir (Frank, 1973; Krogh, 1977).

z Bir mikotoksin olan patulin, *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Byssoschlamys* cinsinden bazı türleri tarafından üretilmektedir (Frank ve ark., 1976).



Patulin

Patulin, 4-hydroxy-4H-furo [3,2-c] pyran-2(6H)-one, doymamış bir lakton olup, kapalı formülü C₇H₆O₄ ve molekül ağırlığı 154 dür. Beyaz kristal halinde ekstrakte edilebilen bu mikotoksinin ergime noktası 110,5°C ve ultraviyole ışın alanında en fazla absorbe edebildiği ışının dalga boyu 276 nm'dir (Woodward ve Singh, 1949). Eter kloroform, etil asetat, etanol ve su içinde çözünebilen patulin, asit ortamda değişmeden kalabilmekte ancak, alkali ortamda kimyasal değişikliğe uğrayarak aktivitesini kaybetmektedir (Pohland ve Allen, 1970).

Expansin, claviformin, clavatin, clavacin, gigantın, leucopin, mycoiin C, penantin, penicidin ve terciin gibi eşanlımlı isimler verilen patulin (Frank ve ark., 1976), 1940 yılında bir antibiyotik olarak bulunmuştur (Glistler, 1941).

*) DSM : Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (Alman Mikroorganizma Koleksiyonu)

Daha sonra yapılan çalışmalarda patulinin nen.

yüksek yapılı bitkilere (Norstadt ve McCalla, 1971) hayvanlara (Ciegler ve ark., 1977; Shreeve ve Patterson, 1975) karşı zehirli, doymamış lakton yapısı sebebiyle de kanserojen bir madde olduğu bulunmuştur (Enomoto ve Saite, 1972).

Patulin daha çok meyve ve sebze gibi bitkisel gıda maddeleri ile bunların ürünlerinde oluşmaktadır. Depolanan elmalarda çürümeye en çok sebep olan *Penicillium expansum*, gıdalarda sık rastlanan *Penicillium urticae* (patulum) ve meyve sularında önemli ölçüde bozulmalara sebep olan *Byssoschlamys nivea*, belirtilen gıdalarda patulin üretmektedir (Frank, 1977; Frank, 1980; Percebois ve ark., 1975 Rice ve ark., 1977). Yemlerde de patulin olduğu belirtilmektedir (Sherecve ve Patterson, 1975).

Çeşitli araştırmacılar mikotoksinlerin belirlenmesinde çeşitli ölçüm teknikleri kullanmıştır. Burmeister ve Hesseltine (1966), aflatoksinine karşı denedikleri 329 mikroorganizma arasında *B. megaterium* NRRL 1368'un en duyarlı mikroorganizma olduğunu bulmuşlardır. Clements (1968 a ve 1968 b) yaptıkları çalışmalarda, aflatoksin B, in biyolojik yolla kantitatif belirlenmesinde *B. megaterium* NRRL 1368'u kullanmışlardır. Stott ve Bullerman (1975), patulinin mikrobiyolojik ölçümü ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada; *B. megaterium* NRRL 1368'un patuline karşı da duyarlı olduğunu, bu toksinin biyolojik yolla hatasız kantitatif ölçümünde bu organizmanın kullanılabilirliğini belirtmişlerdir.

Birçok araştırmacı, yaptıkları çalışmalarda *B. megaterium*'un patuline karşı duyarlı olduğunu, kromatografik ve spektrofotometrik ölçüm metotlarının yanında, bu mikroorganizmanın kantitatif patulin belirlenmesinde güvenle kullanılabilirliğini belirtmektedirler (Buchanan ve ark., 1974; Sommer ve ark., 1974).

Aynı şekilde, çeşitli mikotoksinlerin biyolojik ölçümlerinde; ölçülen mikotoksine karşı duyarlı olan farklı test organizmalarının kullanılabilirliği çeşitli araştırmacılar tarafından be-

lirilmektedir (Burmeister ve Hesseltine, 1970; Capitaine, 1976; Kopp ve Rehm, 1979; Reiss, 1975).

Çalışmanın amacı, test organizmasının patuline karşı duyarlılığını ölçmek, deneme için uygun şartları belirlemektir. Ayrıca, kantitatif patulin ölçümü için standart eğriyi çizmek ve bu eğriden bilinmeyen örneklerdeki patulin miktarının bulunabilmesini araştırmaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

Test Organizması

Test organizması olarak alınan *Bacillus megaterium* DSM 90 suşu, Institut für Mikrobiologie, Grisebachstr. 8, 34 Göttingen/B. Almanya mikrobiyoloji enstitüsünden sağlanmıştır.

Kristal Patulin

Kristal patulin, Prof. Dr. H.K. Frank, Direktör des Inst. für Biologie der BfE, Engesserstr. 20, 75 Karlsruhe/A. Almanya ve SERVA Feinbiochemica, 69 Heidelberg/B. Almanya firmasından temin edilmiştir.

Besiyerleri

Tripton Yeast Glukoz (TYG) - Buyyon
Tripton 5.0 g, Yeast ekstrakt 2,5 g, Glukoz 1.0 g, Destile su 1000.0 ml, pH: 7.1.
Tripton Yeast Glukoz (TYG) - Agar
TYG - Buyyon + % 1.0 Agar - agar, pH: 7.1.
Her iki besiyeri de otoklavda, 121°C de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Gerekli Malzeme

Petri kutuları (camdan 100 x 15 mm ölçülerinde, steril). Ölçme diskleri (boş antibiyotik diskleri, Ø 6.0 mm, Schleicher und Schüll, Nr. 2668). Kompas veya cetvel.

2.2. METOT

Besiyerinin Aşılması ve Petri Kutularına Dökülmesi

Test organizması olarak alınan *B. megaterium* DSM 90 suşu TYG - Buyyona aşılansak 37°C de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Er-lenmayer kaplarında sterilize edilmiş ve 50°C - 55°C ye soğutulmuş TYG - Agar, yukarıda be-

İrtildiği şekilde hazırlanan *B. megaterium* DSM 90 suşunun TYG - Buyyon içindeki kültürü ile ($20 \cdot 10^4$ hücre/ml) % 1 oranında aşılansmıştır. İyice çalkalanan TYG - Agar, önceden $50^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$ ye kadar ısıtılmış petri kutularına, steril 10 ml'lik pipetlerle 5'er ml dağıtılmış ve besiyerinin homojen bir şekilde petri kutusu içinde yayılarak katılaşması beklenmiştir (Burmeister ve Hesseltine, 1966); Clements, 1968 a ve 1968 b).

Standart Patulin Disklerinin Hazırlanması

Kristal patulin kloroform (CHCl_3) içinde çözümlenerek, şırıngalı mikropipet (Hamilton Dispenser, No. 710) ile, 6.0 mm çapındaki beş antibiyotik disklere 0.0, 1.5, 3.0, 14.7, 29.4, 58.8, 117.6 ve 147.0 μg patulin/disk olacak şekilde patulin çözeltisi emdirilmiştir. Kontrol disklerine sadece kloroform emdirilmiş ve 15 dakika süreyle disklerin kuruması beklenmiştir.

Inkübasyon ve Ölçme İşlemi

Petri kutularındaki katılaşan agar üzerine, patulin çözeltisi emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları, 4°C de 1 saat süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra petri kutuları, 37°C de 15 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda diskler etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları cetvel veya kompas

ile ölçülmüş ve mm olarak kaydedilmiştir (Clements, 1968 a ve 1968 b; Stott ve Bullerman, 1975).

Standart Eğrinin Hazırlanması

Altı tekerrürlü olarak ölçülen inhibisyon zonlarının ortalama değerleri mm olarak x - eksenine üzerine ve bunlara ait patulin ($\mu\text{g}/\text{disk}$) değerleri yarı logaritmik çizim kağıdının y - eksenine üzerine yerleştirilerek standart eğri çizilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kullanılan *B. megaterium* DSM 90 suşunun patuline karşı duyarlı olduğu ve biyolojik patulin ölçümünde test organizması olarak kullanılabilceği bulunmuştur.

4°C de 1 saat süreyle uygulanan ön inkübasyon sırasında, organizma gelişmesi durdurularak patulinin agar içinde yayılmasına (difüzyonuna) fırsat verilmiş ve bunun sonucu okunaklı ve büyük inhibisyon zonları oluşmuştur. Petri kutularının önceden $50^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C}$ ye kadar ısıtılması, içlerine dökülen agarın homojen dağılmasını ve her yerde eşit kalınlıkta olmasını sağlamıştır.

Disklere emdirilen patulin miktarları ve ölçülen inhibisyon zonları Çizelge 1 de verilmiştir.

Çizelge 1. Patulin emdirilmiş disklerin *B. megaterium* DSM 90 ile aşılansmış agar da oluşturdukları inhibisyon zonları

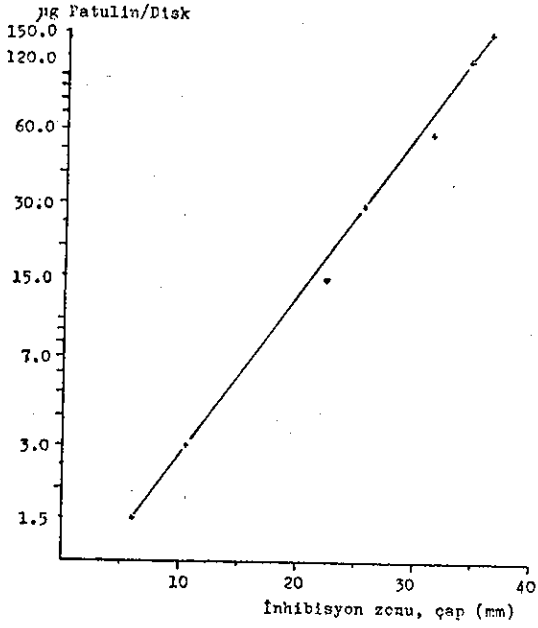
μg Patulin/Disk	0	1.5	3.0	14.7	29.4	58.8	117.6	147.0
Inhibisyon	+	6.0	11.0	20.0	22.5	30.0	36.0	37.0
Zonu,	+	6.0	10.8	19.8	22.1	33.0	38.0	42.0
çap (mm)	+	6.0	8.5	20.0	22.0	26.6		
	+	6.0	8.5	20.0	23.0	27.0	30.0	31.0
	+	6.0	11.0	27.0	32.0	35.0	34.0	35.5
	+	6.0	14.0	27.8	31.0	36.0	34.0	35.0
Ortalama	+	6.0	10.6	22.4	25.4	31.3	34.4	36.1

+ : Gelişme normal, zon yok.

Çizelge 1 de görüldüğü gibi 1.5 — 147.0 μg patulin/disk değerlerine karşı ölçülen inhibisyon zonlarının çapları 6.0 — 36.1 mm de-

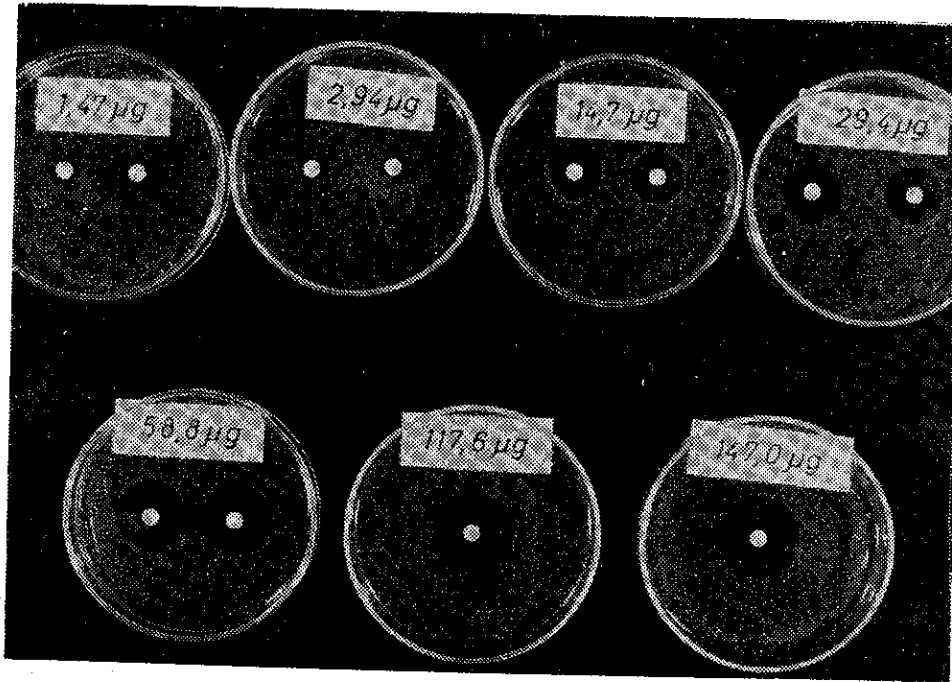
ğerleri arasında bulunmuştur. Artan patulin miktarına göre inhibisyon zonu büyüklüğünün aynı oranda artmadığı, ancak yarı logaritmik bir

kağıt üzerindeki bir çizimde, bu iki değer arasında lineer bir ilişkinin olduğu görülmektedir (Çizim 1) (Resim 1). Stott ve Bullerman (1975), aynı şekilde, 2-80 μg toksin değerleri arasında organizma duyarlılığının lineer olduğunu bulmuşlardır.



Resim 1 de görüldüğü gibi, farklı miktarlarda patulin ihtiva eden kağıt diskler etrafındaki inhibisyon zonları farklı büyüklüklerde, okunaklı bir şekilde oluşmuştur.

Alınan sonuçlara göre; çeşitli gıda ve yem örneklerinden elde edilen ekstraktlarda biyolojik yolla patulin ölçümü yapılabilir. Örnek ekstraktlarının emdirildiği diskler etrafında oluşan zon değerleri standart eğri değerleri ile karşılaştırılarak, toksin muhtevası bilinmeyen örneklerdeki patulin miktarını hesaplamak mümkündür. Bu ölçüm metodu, aflatoksin, ochratoksin, roquefortin, *Fusarium* toksinleri (butenolide ve T-2 toksin) v.b. mikotoksinlerin biyolojik ölçümlerinde de kullanılabilir (Burmeister ve Hesseltine, 1970; Clements, 1968 a ve 1968 b; Kopp ve Rehm, 1979; Stott ve Bullerman, 1975).



Resim 1. Farklı miktarlarda patulin ihtiva eden disklerin *B. megaterium* DSM 90 ile aşılınmış agarda oluşturdukları inhibisyon zonları

Patulin ve diğer mikotoksinlerin belirlenmesinde uygulanan bu biyolojik (mikrobiyal) ölçüm metodu hızlı, basit ve özellikle ucuz bir metottur. Gaz, likit ve ince tabaka kromatografisi gibi pahalı alet ve cihazların olmadığı laboratuvarlarda güvenle uygulanabilecek bir metottur. Ancak, her ölçümde yeni bir standart eğrinin hazırlanması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Araştırmanın yürütülmesi için Enstitüsünde imkân sağlayan Prof. Dr. E. Küster'e, kristal patulin gönderen Prof. Dr. H.K. Frank'a, Enstitülerinden test organizmasını temin ettiğim Prof. Dr. H.G. Schlegel ve Prof. Dr. Pfennig'e içtenlikle teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Buchanan, J.R., N.P. Sommer, R.J. Fortlage, E.C. Maxie, F.G. Mitchell and D.P.H. Hsieh 1974. Patulin from *Penicillium expansum* in Stone Fruits and Pears. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 99 (3): 262 - 265.
- Burmeister, H.R. and C.W. Hesseltine 1966. Survey of the Sensitivity of Microorganisms to Aflatoxin. *Appl. Microbiol.*, 14 (3): 403 - 404.
- Burmeister, H.R. and C.W. Hesseltine 1970. Biological Assays for Two Mycotoxins Produced by *Fusarium tricinctum*. *Appl. Microbiol.*, 20 (3): 437 - 440.
- Capitaine, R. 1976. Application de la méthode bio-autographique à la détection de la patuline. *Cahiers de Nutr. et de Diététique*, Vol. II, 2 (Suppl.): 95 - 97.
- Ciegler, A., R.F. Vesonder and L.K. Jackson 1977. Production and Biological Activity of Patulin and Citrinin from *Penicillium expansum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 (4): 1004 - 1006.
- Clements, N.L. 1968 a. Note on a Microbiological Assay for Aflatoxin B₁: A Rapid Confirmatory Test by Effects on Growth of *Bacillus megaterium*. *J. of the AOAC*, 51: 611 - 612.
- Clements, N.L. 1968 b. Rapid Confirmatory Test for Aflatoxin B₁ Using *Bacillus megaterium*. *J. of the AOAC*, 51 (6): 1192 - 1194.
- Enomoto, M., and M. Saite 1972. Carcinogens Produced by Fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, 26, 279 - 312.
- Frank, H.K. 1973. Einführung in die Problematik der Mykotoxine. *Z. Lebensm. Unters. - Forc.*, 151: 225 - 230.
- Frank, H.K., R. Orth und R. Hermann 1976. Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, 1. Kernobst und daraus hergestellte Produkte. *Z. Lebensm. Unters. - Forsch.*, 162: 149 - 157.
- Frank, H.K. 1977. Occurrence of Patulin in Fruit and Vegetables. *Ann. Nutr. Alim.*, 31: 459 - 465.
- Frank, H.K. 1980. Patulin in Produkten pflanzlicher Herkunft. *Confructa* 25, No. 3/4: 107 - 118.
- Gilster, G.A. 1941. A New Antibacterial Agent Produced by a Mould. *Nature* 148: 470.
- Kopp, B. und H.J. Rehm 1979. Ein biologischer Test zur quantitativen Bestimmung von Roquefortin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 169: 90 - 91.
- Krogh, P. 1977. Mycotoxin Tolerances in Foodstuffs. *Ann. Nutr. Alim.*, 31: 411 - 414.
- Norstadt, F.A. and T.M. McCalla 1971. Effects of Patulin on Wheat Grown to Maturity. *Soil Sci.*, 111 (4): 236 - 243.
- Percebois, G., A.M. Basile et A. Schwertz 1975. Existence commune, sur les fraises d'ascospores de *Byssosclamyces nivea* pouvant produire de la patuline. *Mycopathologia* 57 (2): 109 - 111.
- Pohland, A.E., and R. Allen 1970. Stability Studies with Patulin. *J. of the AOAC* 53: 688 - 691.
- Reiss, J. 1975. Mycotoxin Bioassay, Using *Bacillus stearothermophilus*. *J. of the AOAC* 58 (3): 624 - 625.
- Rice, S.L., L.R. Beuchat, and R.E. Worthington 1977. Patulin Production by *Byssosclamyces* spp. in Fruit Juices. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34 (6): 791 - 796.
- Shreeve, B.J., and D.S.P. Patterson 1975. Mycotoxicosis. *The Veterinary Record* 97: 279 - 280.
- Sommer, N.F., J.R. Buchanan, and R.J. Fortlage 1974. Production of Patulin by *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.*, 28 (4): 589 - 593.
- Stott, W.T., and L.B. Bullerman 1975. Microbiological Assay of Patulin, Using *Bacillus megaterium*. *J. of the AOAC* 58 (3): 497 - 499.
- Woodward, R.B., and G. Singh 1949. The Structure of Patulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 71: 758 - 759.