



OKAN ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL



Kümes Altlıklarında Üreyen Küf ve Bakterilere Karşı Koruyucu *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* Uygulamaları

Şems Yonsel, Okan Üniv. Müh. Mim. Fak. Gıda Müh.
Miray Demir ve Tülay Şahin, Simbiyotek Biyolojik Ürünler A.Ş.

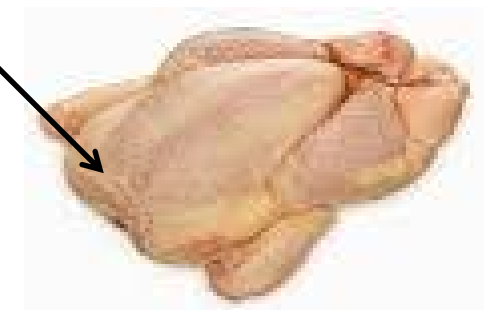
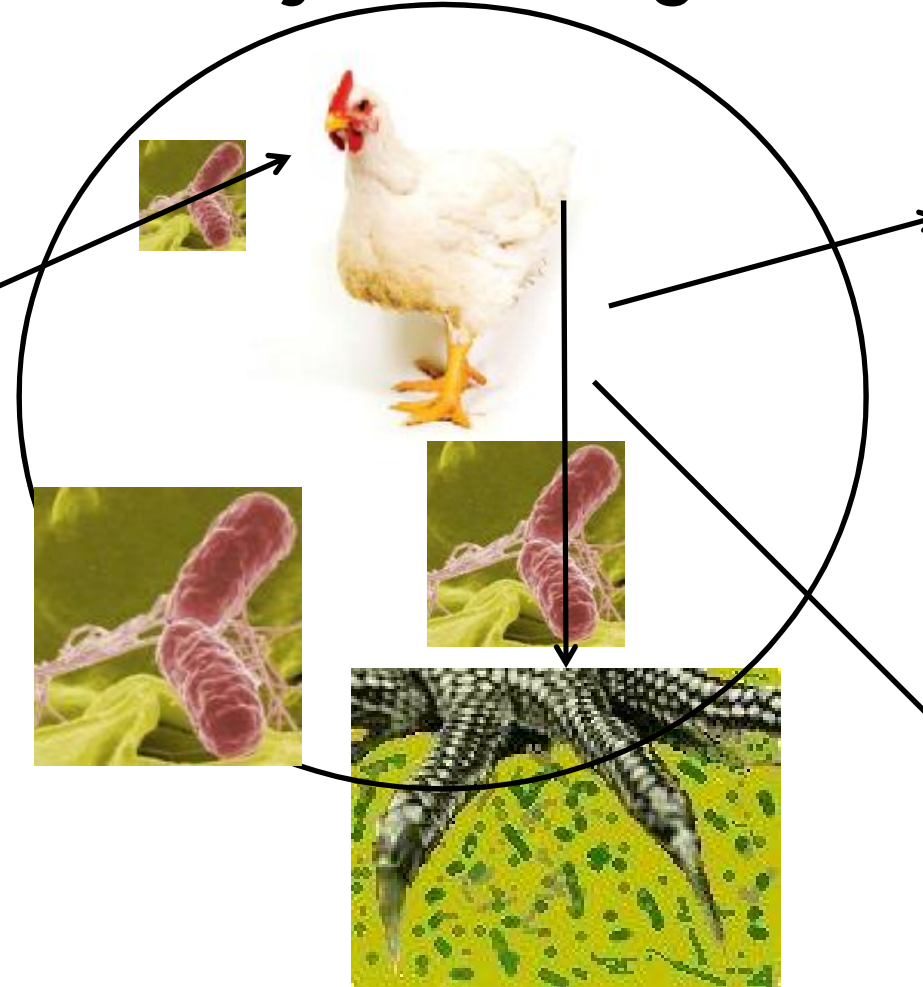
4. Gıda Güvenliği Kongresi
14-15 Mayıs 2013 İstanbul

sems.yonsel@okan.edu.tr

Türkiye'de kanatlı sektörü 2012

- Kanatlı eti üretimi 1 830 000 ton
- Ciro 8 milyon TL
- İstihdam 600 000 kişi
- Sektörden geçimini sağlayanlar 2 400 000
- Kanatlı eti tüketimi 1 538 000 ton
- Kişi başı et tüketimi:
 - 19,3 kg kanatlı
 - 10,7 kg sığır
 - 1,5 kg koyun

Patojen döngüsü



Civciv, yem, su ve zararlılarla taşınan patojenler (bakteri, küf) uygun ortamlarda (bağırsak, altlık) çoğalır

Bakteriler (*Salmonella* spp.)

- AB ülkeleri broiler kümeslerinde (Ekim 2005-Eylül 2006) yapılan çalışmanın sonuçları 2007 yılında EFSA tarafından yayınlanmıştır:
- Kesimden 3 hafta önce alınan örneklerin % 23,7 si *Salmonella* spp. pozitif bulunmuştur. Farklı boyutlarda olmak kaydıyla tüm Avrupa birliği ülkelerinde *Salmonella* spp. sorunu vardır.
- *Salmonella* spp. kanatlı üretiminde insan sağlığını tehdit edebilen yaygın bir patojendir ve indikatör olarak seçilebilir.

Küflerin ürettiği zehirli maddeler: Mikotoksinler

Mikotoksinler	Mantar	Yem türleri	Toksik etki
Aflatoksinler	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticu</i>	tahıl, soya fıstık, mısır	Hepatotoksik, karsinojen, verim düşürücü, bağışıklık baskılayıcı, anemi, tüy ve yumurta bozuklukları, karaciğer ve böbrek deformasyonu
Okratoksinler	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	tahıl	hepatotoksik, nefrotoksik, zayıflama
Zearalenone	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium tricinctum</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	tahıl	bağışıklık baskılayıcı, yumurta azalır hiperöstrojenik, kısırlık, üreme sorunları
Vomitoksin T-2 toksin	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium tricinctum</i>	tahıl mısır, tahıl	iştahsızlık, zayıflama gastrointestinal sistem iltahabı, dermatit, anemi
Fumonisin	<i>Fusarium moniliforme</i>	mısır	lökoensefalomalastik

Mikotoksinlerin zararlı toksik seviyeleri

Aflatoksin	200-500 ppb	Yem yönetmeliğine göre
Fumonisin	5 ppm	Kanatlı karma yeminde azami
T-2 toksin	100 ppb	0,02 ppm aflatoksin
Zearalenon	200-300 ppb	bulunabilir



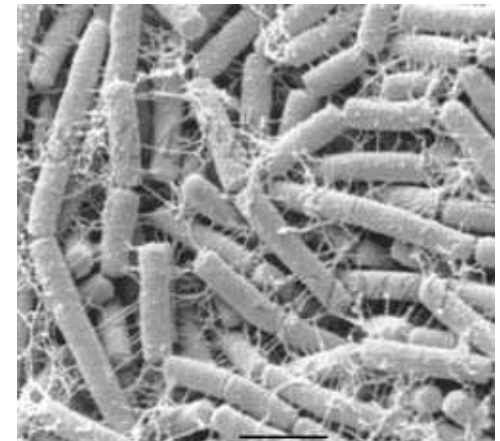
Mikroorganizmalarla Savaş

Paradigma 1

- Kanatlı yetiştiriciliğinde civciv, yem, su ve zararlılarla taşınan patojenler uygun ortamlarda (sindirim sistemi, altlık) çoğalmaktadır
- Biyogüvenlik: Patojen mikroorganizmaları öldürmek gereklidir
- Seçici olmayan yöntemler: antibiyotikler, biyosidal kimyasallar, ısı işlemler (peletleme) ile sanitizasyon neticesinde
- patojen olmayan 'zararsız' hatta 'faydalı' mikroorganizmalar da ölmektedir

Bacillus subtilis ve *Bacillus cereus* özellikleri

- Gram+, fakültatif aerobik, spor oluşturan
- Endosporlar ısı, ışık, donma, kuruma, radyasyon gibi fiziksel faktörlere, dezenfektanlar ve kimyasal maddelere, mekanik etkilere karşı çok dayanıklı
- Antibakteriyal-antifungal maddeler, enzimler salgılanması
- İnsan, hayvan, bitkilere zararsız



Yem katkısı olarak yönetmeliklerde *Bacillus subtilis, Bacillus cereus*

- Yem Katkı Ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğ, RG 18.12.2002, Ek-U Mikroorganizmalar. EK-1 / U-Mikroorganizmalar:
- EU Council Directive 70/524 of 23 November 1970, Concerning additives in feeding-stuffs, Annex 1 Micro-organisms:
- **Bacillus cereus**, Saccharomyces cerevisiae, Enterococcus faecium, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus farciminis, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei, Streptococcus infantarius, Lactobacillus plantarum, Bacillus licheniformis, **Bacillus subtilis**

Laboratuvar metotları

Bakteri canlı hücre sayımı: (PCA) ortamı

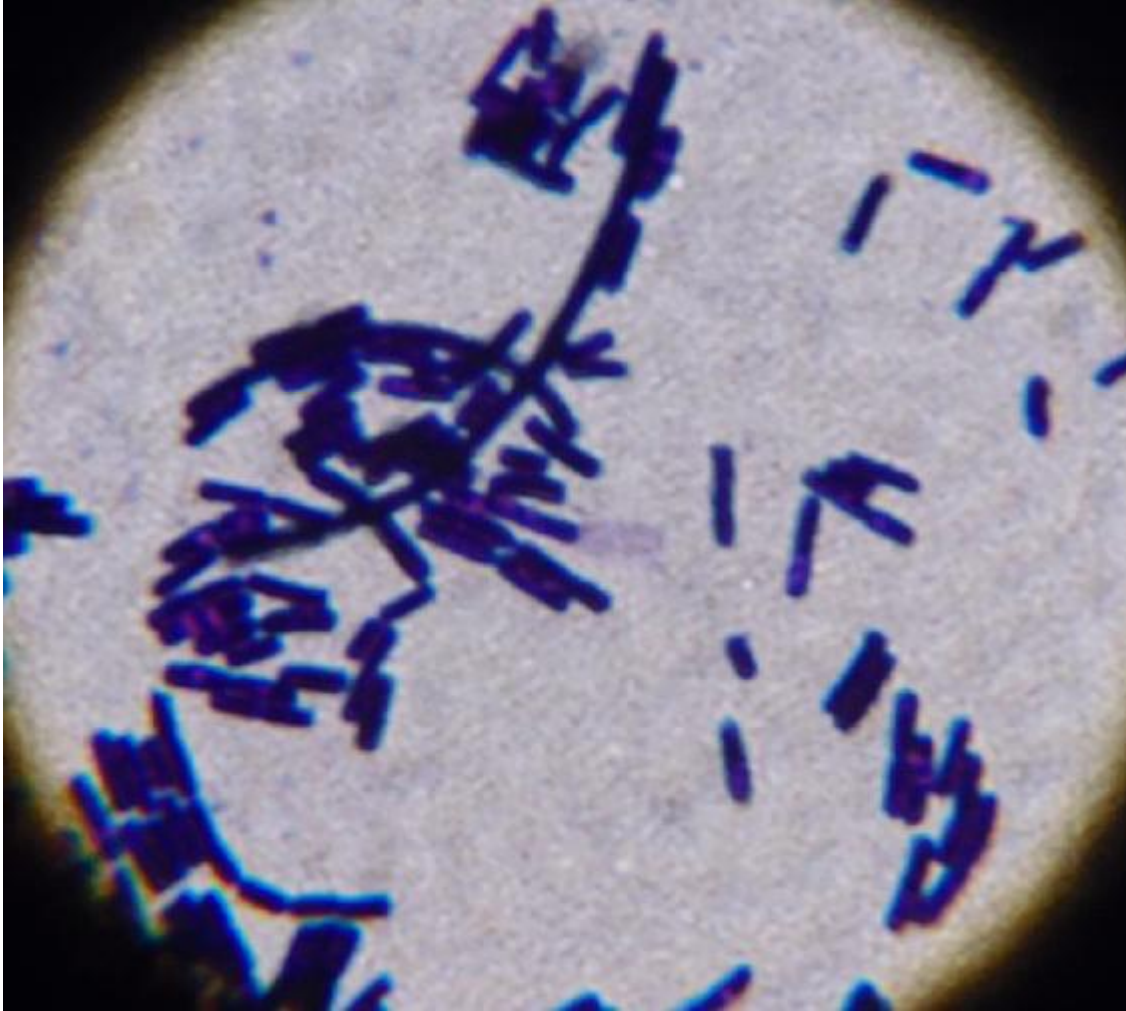
Salmonella spp. tayini Bursa Gıda Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsünde, BAM 2002

Fungus canlı hücre sayımı: (PDA) ortamı



Bacillus subtilis KUEN 1581 kolonileri

Laboratuvar metotları



Gram +
boyama
Bacillus subtilis

Laboratuvar metotları

- Koku paneli
- Örneklerin kokusunu sayısal bir değere dönüştürmek için 5 kişilik panel uygulaması yapılmış, en iyi koku 1 ve en kötü koku 6 ile değerlendirilerek skala oluşturulmuştur. Örneklerin ambalajı açıldıktan hemen sonra panele katılan kişiler materyali koklamış, değerlendirmiş ve değerlerin ortalaması alınmıştır.

Formülasyonlar

- Simbiyotek A.Ş. tarafından izole edilen *Bacillus subtilis* suşu KUEN 1581 ve *Bacillus cereus* var. toyoi suşu KUEN 1594 no ile KÜKENS katalogunda kayıtlıdır
- *Bacillus subtilis* KUEN 1581 (Sim Silaj) sıvı formülasyon, en az 2×10^9 KOB/mL
- *Bacillus cereus* var. toyoi KUEN 1594 (Sim Pro-L) sıvı formülasyon, en az 2.5×10^9 KOB/mL
- *Bacillus cereus* var. toyoi KUEN 1594 (Sim Pro) toz formülasyon, en az 2×10^9 KOB/g

Bacillus subtilis KUEN 1581

Etkinlik denemeleri

- Hayvan barınaklarında zemin ve altlıklarda gübre birikmesi kötü koku, amonyak emisyonu, patojen mikroorganizmaların çoğalması gibi hayvan sağlığını bozucu sorunlara yol açmaktadır.
- *Bacillus subtilis* KUEN 1581 küf ve bakterilere karşı koruyucu, koku giderici ve amonyak emisyonu azaltıcı olarak kullanılması



T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
MÜHENDİSLİK VE MİMARLIK FAKÜLTESİ
GENETİK ve BİYOMÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ

RAPOR

BİYOLOJİK ETKİNLİK DENEMELERİ SONUÇ RAPORU

RAPOR KAYIT NUMARASI VE TARİHİ: 01-MD-2011

14.01.2011

NUMUNE KAYIT NUMASI: 2011-001

NUMUNYİ GÖNDEREN KURUM: İstanbul Valiliği, İl Sağlık Müdürlüğü

NUMUNYİ ÜRETEN FİRMA VE ADRESİ: Simbiyotek Biyolojik Ürünler San. Ve Tic. A.Ş.
Okul C. 26 Orhanlı/Tuzla/İstanbul

RUHSAT SAHİBİ FİRMA: Simbiyotek Biyolojik ürünler San. Ve Tic. A.Ş. Okul C. 26
Orhanlı/Tuzla/İstanbul

DENEMENİN AMACI: Biyolojik Etkinlik

DENEMEYİ YAPAN: Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve
Biyomühendislik Bölümü

DENEME TARİHİ: 13.01.2011

DENENEN ÜRÜN ADI:

DENENEN ÜRÜN CİNSİ: Biyosit

ÜRÜNÜN BİLEŞİMİ: *Bacillus subtilis*

DENEME METODU: Disk Difüzyon

DENEME ORTAMI KOŞULLARI: Bakteri: 37 °C, Maya: 37 °C, Fungus: 25 ± 3°C



YORUM: İstanbul Valiliği, İl Sağlık Müdürlüğü tarafından gönderilen | Biyosidal ürün örnekleri Biyolojik Etkinlik denemelerinin yapılması için 04.01.2011 tarihinde tarafımızdan teslim alınmıştır. Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde Disk Difüzyon metoduna göre ekte listesi verilen 8 adet mikroorganizma (2 Adet Bakteri, 5 Adet Fungus, 1 Adet Maya) türü test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Biyolojik Etkinliği incelenen biyosidalin *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 adlı mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etki gösterirken; fungus ve mayalara karşı etkili olmadığı, ancak listede belirtilen maya ve fungusları statik etki ile gelişmelerini inhibe ettiği tesbit edilmiştir.

Yeditepe Üniversitesi, 26 Ağustos Yerleşimi, Kayışdağı Caddesi 34755 Kayışdağı / Ataşehir- İSTANBUL

Tel: (0 216) 578 00 00 - 578 06 19 Faks: (0 216) 578 04 00 - 578 08 29

www.yeditepe.edu.tr

Bir örnek: kümes suluklarında mikrobiyolojik kirlenme

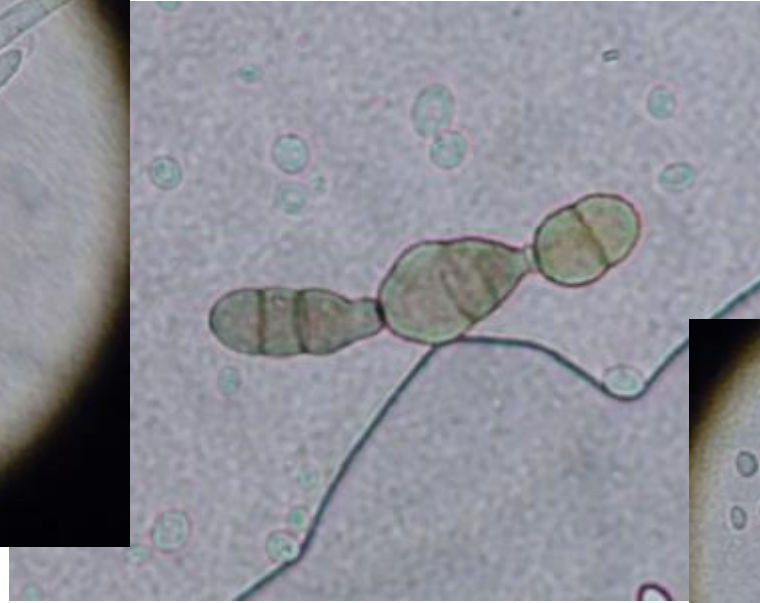


400 mL/t dozajında
% 59,8 H₂O₂ ve 300
mg/L kollodial gümüş
içeren biyosidal ürün
(Hydrocare) uygulanmış
içme suyu sistemi suluk
nipelinde bulunan
mikrobiyolojik tortu
izmir 2010

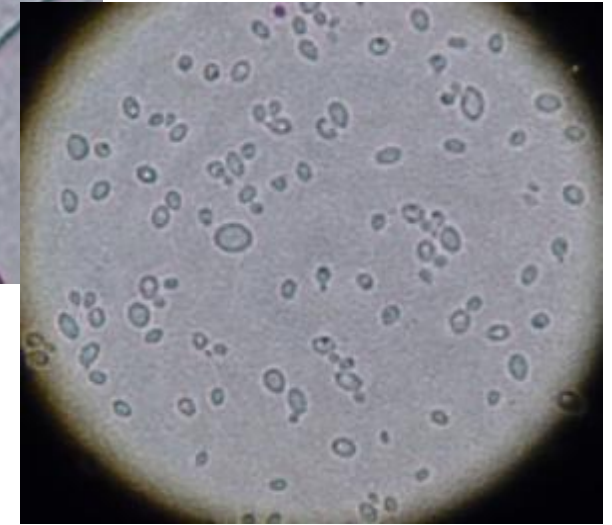
Kümes suluklarında mikrobiyolojik kirlenme



Fungus (204)



Alternaria sp.



Maya (205)

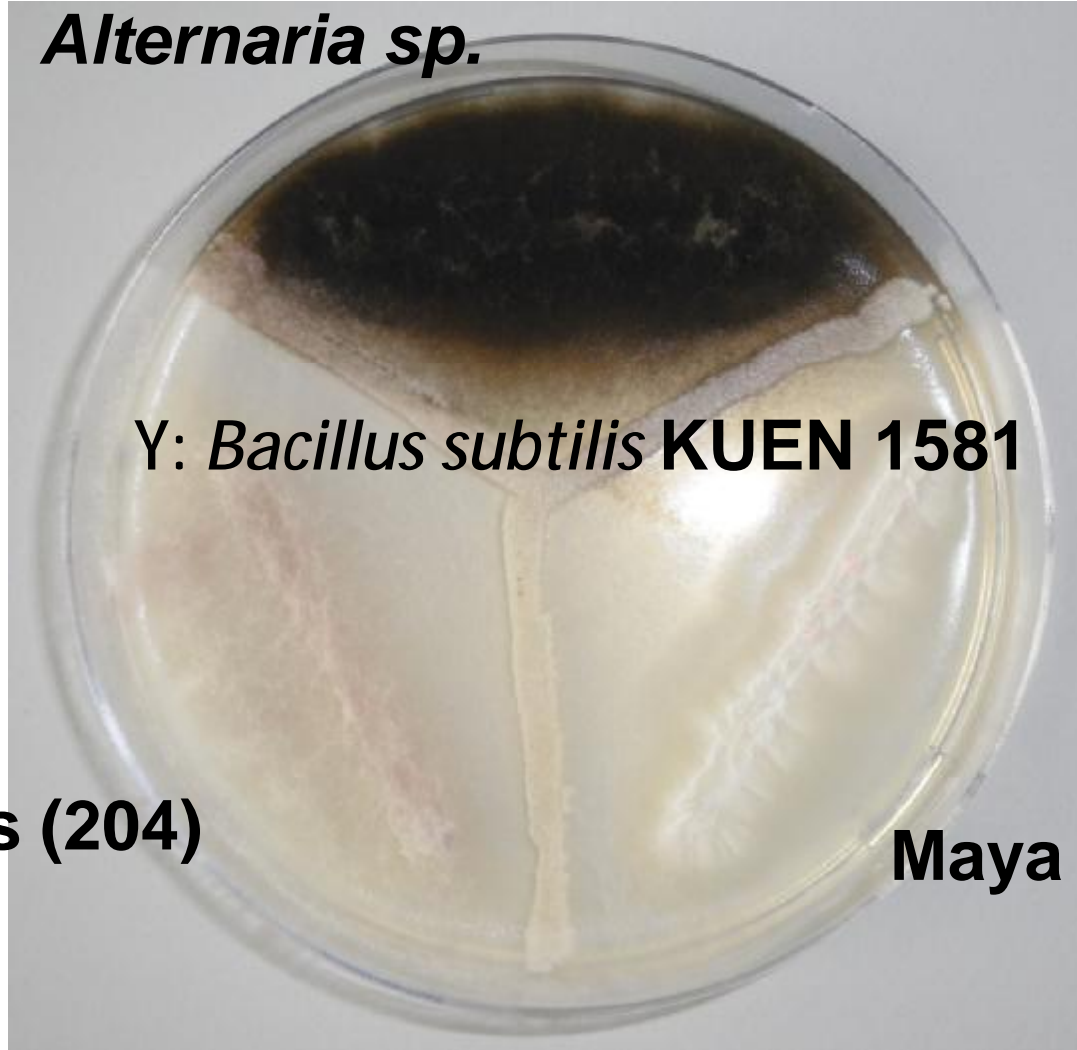
Kümes suluklarında mikrobiyolojik kirlenme

Alternaria sp.

Y: *Bacillus subtilis* KUEN 1581

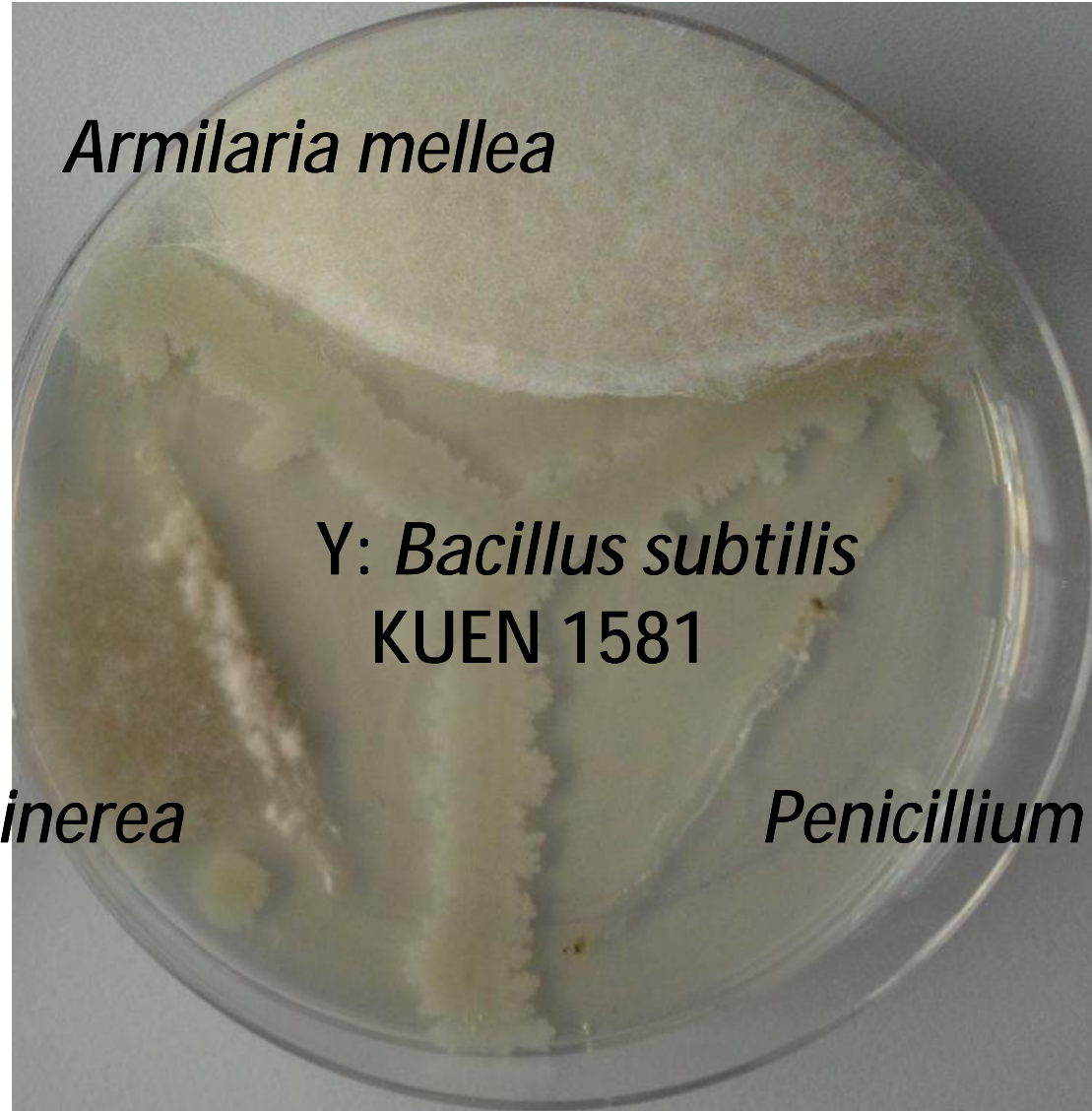
Fungus (204)

Maya (205)



Bacillus subtilis KUEN 1581

Funguslara karşı etki



Armillaria mellea

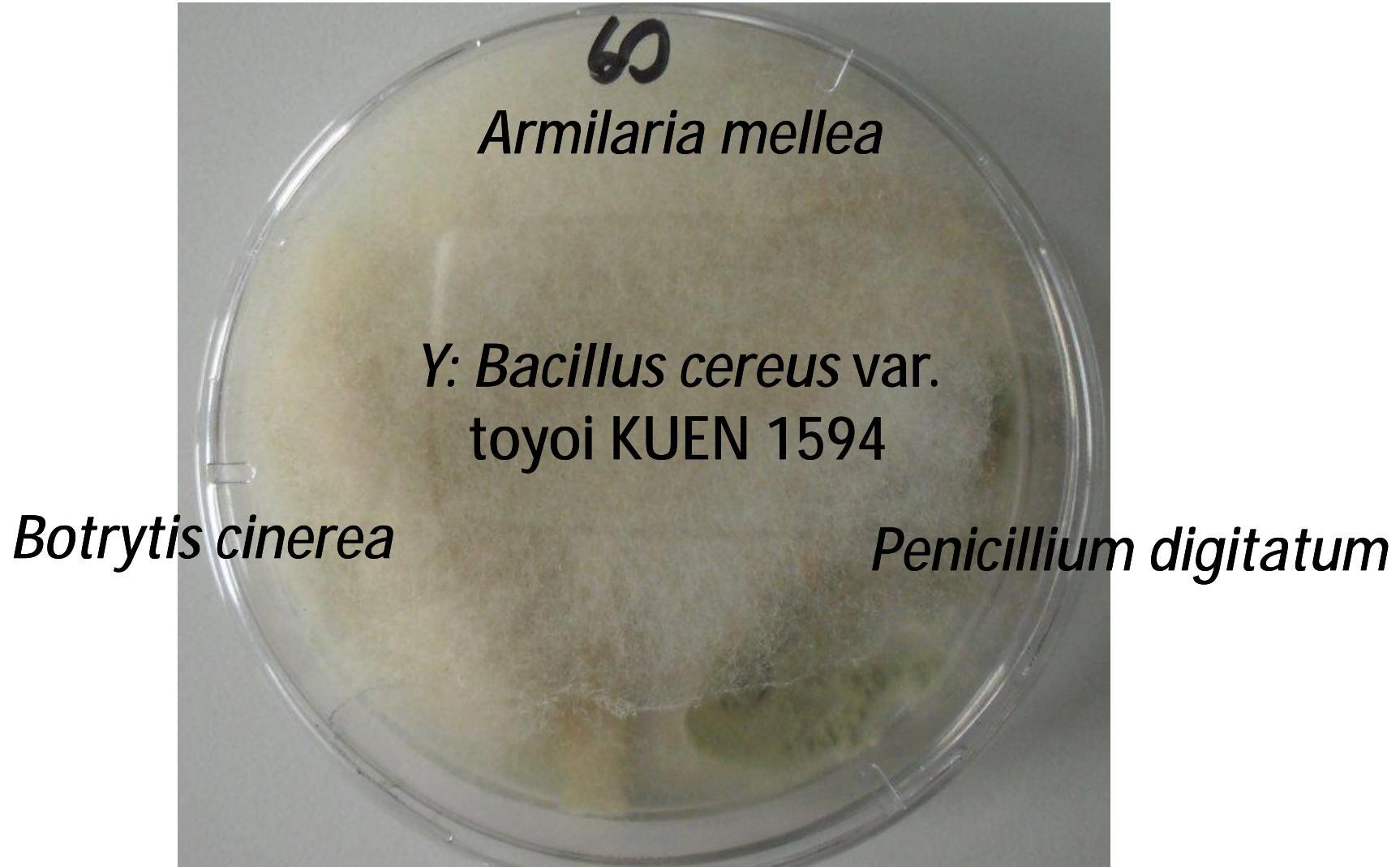
Y: Bacillus subtilis
KUEN 1581

Botrytis cinerea

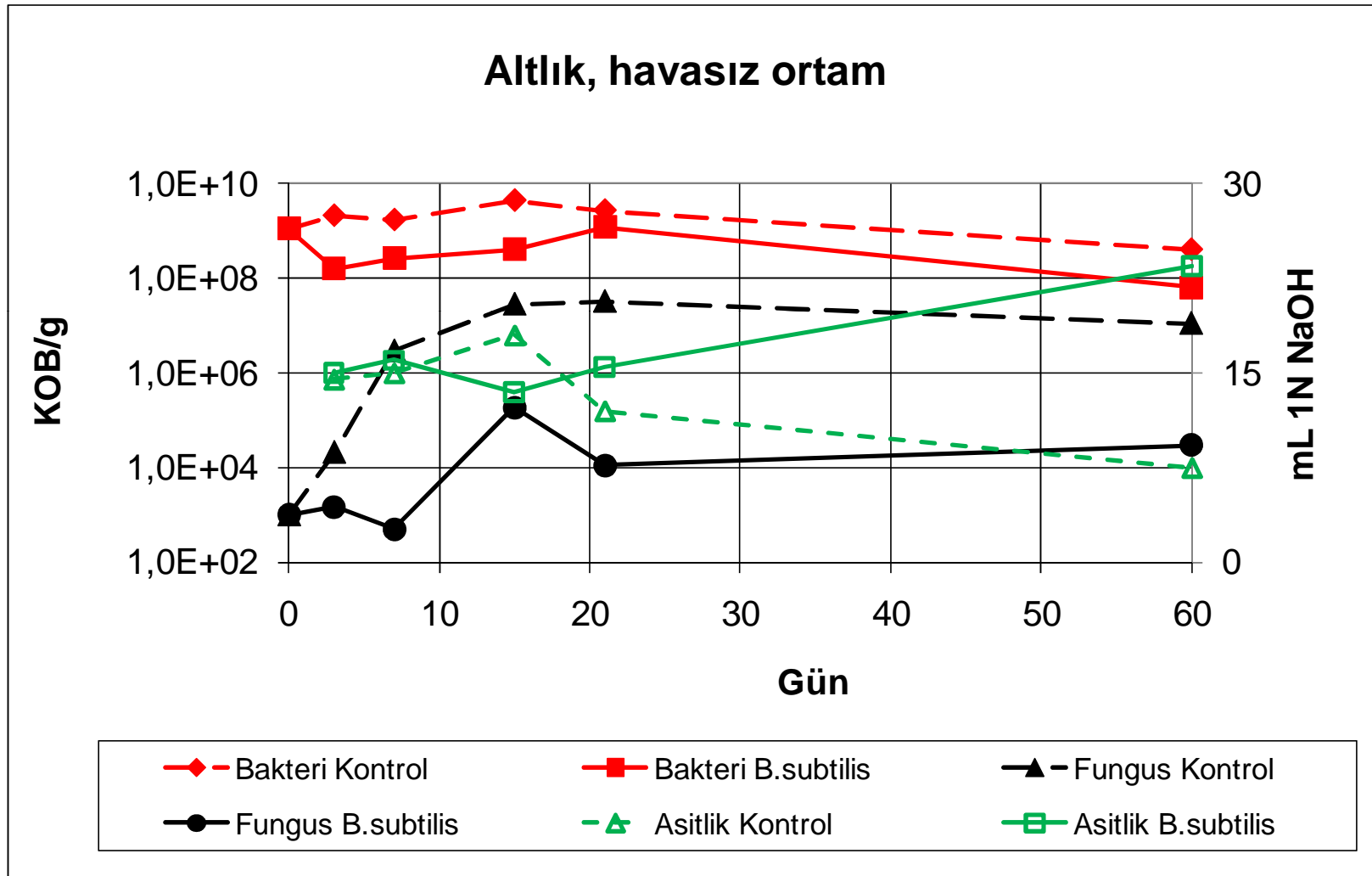
Penicillium digitatum

Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594

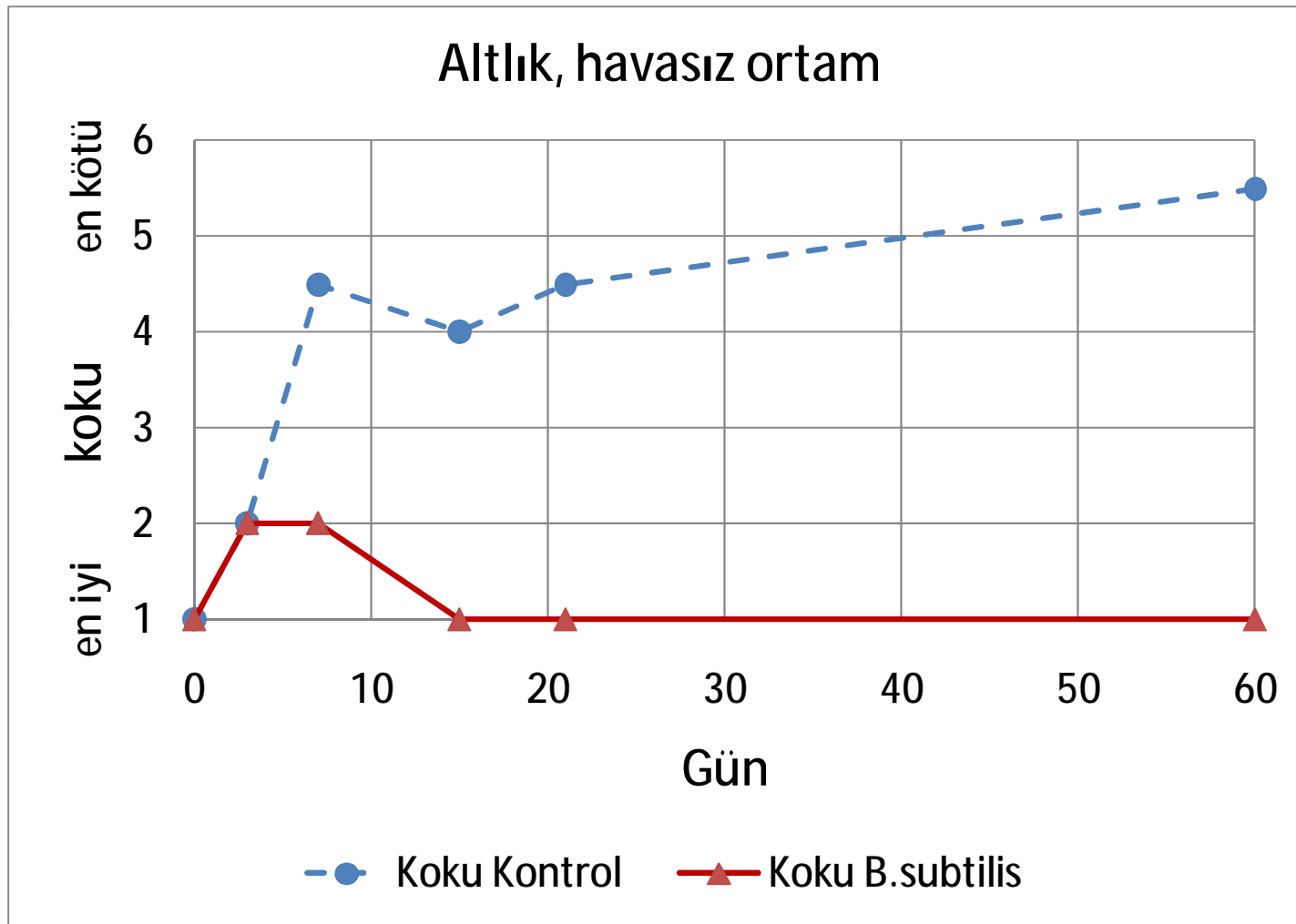
Funguslara karşı etki



Havasız ortamda altlık materyaline *Bacillus subtilis* KUEN 1581 uygulaması



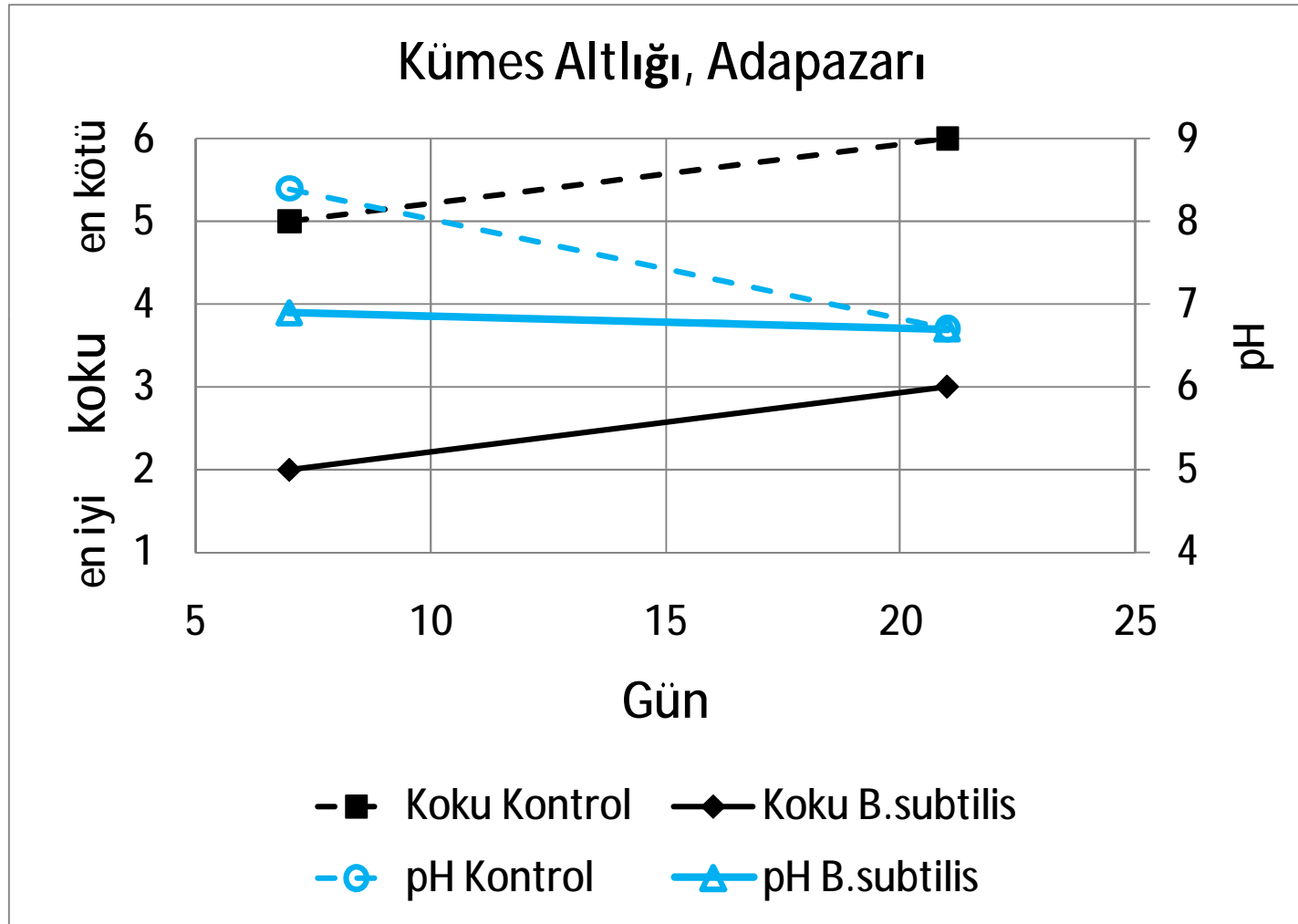
Havasız ortamda altlık materyaline *Bacillus subtilis* KUEN 1581 uygulaması



Kümes altlığında *Bacillus subtilis* KUEN 1581 uygulamaları

- Adapazarı bölgesinde bir üretici kümesinde, kavuz ve çeltik türü kümes altlıklarına uygulama
- $2 \cdot 10^9$ KOB/mL *Bacillus subtilis* KUEN 1581 içeren 1 L formülasyon 10 L su ile seyreltilmiş, yaklaşık 400-500 m² kümes altlığına püskürtülerek uygulanmıştır. Kontrole aynı miktarda su püskürtülmüştür.
- Uygulamalardan sonra kümeslere tavuklar alınmış ve deneme başlamıştır.
- Örnekler uygulamadan sonraki 7. ve 21. günlerde alınmıştır
- Analiz Parametreleri: koku, pH, asitlik titrasyonu, mikroorganizma sayımları

Kümes altlığında *Bacillus subtilis* KUEN 1581 uygulamaları



Kümes altlığında *Bacillus subtilis* KUEN 1581 uygulamaları

Uygulama Gün	Fungus	Bakteri	<i>B.subtilis</i>	<i>Salmonella</i> KOB/25g
Kontrol 7. Gün	1,0 10 ⁸	3,5 10 ¹⁰	-	Var
<i>B. subtilis</i> 7. Gün	5,7 10 ⁶	-	1,5 10 ¹⁰	Yok
Kontrol 21. Gün	9,0 10 ⁷	1,2 10 ¹⁰	-	Var
<i>B.subtilis</i> 21. Gün	1,5 10 ⁷	9,1 10 ⁸	-	Var

Kümes altlığında mikroorganizmalar [KOB/g]

Bacillus subtilis KUEN 1581

Sonuçlar

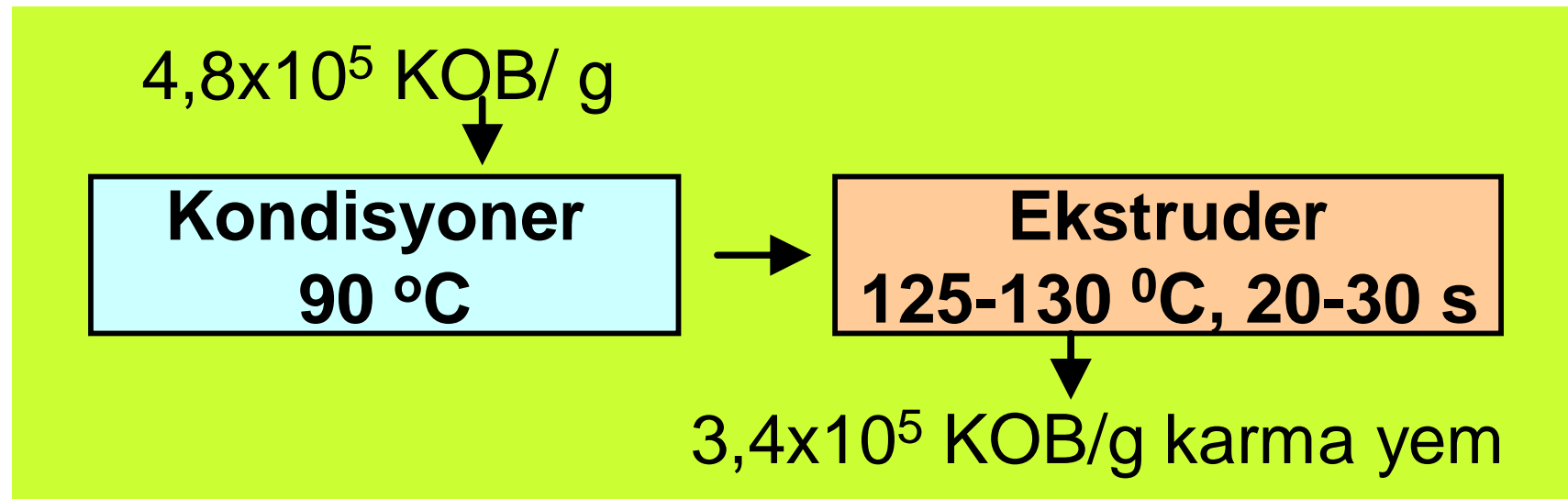
- Deneme süresinde altlığa sürekli taze gübre eklendiği için *Bacillus subtilis* KUEN 1581'in koruyucu etkisi azalmakta ve diğer bakteriler ortama tekrar hakim olmaktadır.
- Kümes altlıklarında *Bacillus subtilis* KUEN 1581 uygulamalarının 7-10 günde bir tekrarlanması tavsiye edilebilir
- Havasız ve havalı ortamlarda *Bacillus subtilis* KUEN 1581 altlık malzemelerindeki küf ve bakterileri baskılamış, kötü koku azalmış, asitlik artmıştır
- Böylece hayvan barınaklarında daha sağlıklı koşullar sağlanabilir

Bacillus cereus var. *toyoi* Büyüme faktörleri

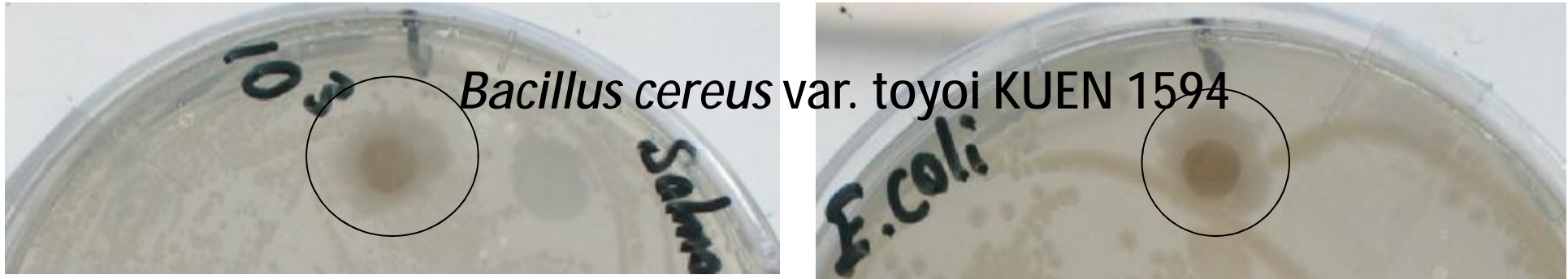
- * Kanatlı besiciliğinde antibiyotiklerin büyüme faktörü olarak kullanılması 21 Temmuz 2006 itibarı ile yasaklanmıştır.
- * Antibiyotik ikamesi olarak kullanılabilecek yem katkı maddesi sınıflarından biri de probiyotiklerdir.
- * *Bacillus cereus* var. *toyoi* ve antibiyotik Virginiamycin büyüme faktörü olarak karşılıklı denenmiştir. Her iki katkı da günlük büyümeyi ve yemden yararlanma oranını aynı oranda artırmıştır.

Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594 Isıya dayanıklılık

Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594 toz formülasyon
katkısı ile balık yemi peletleme



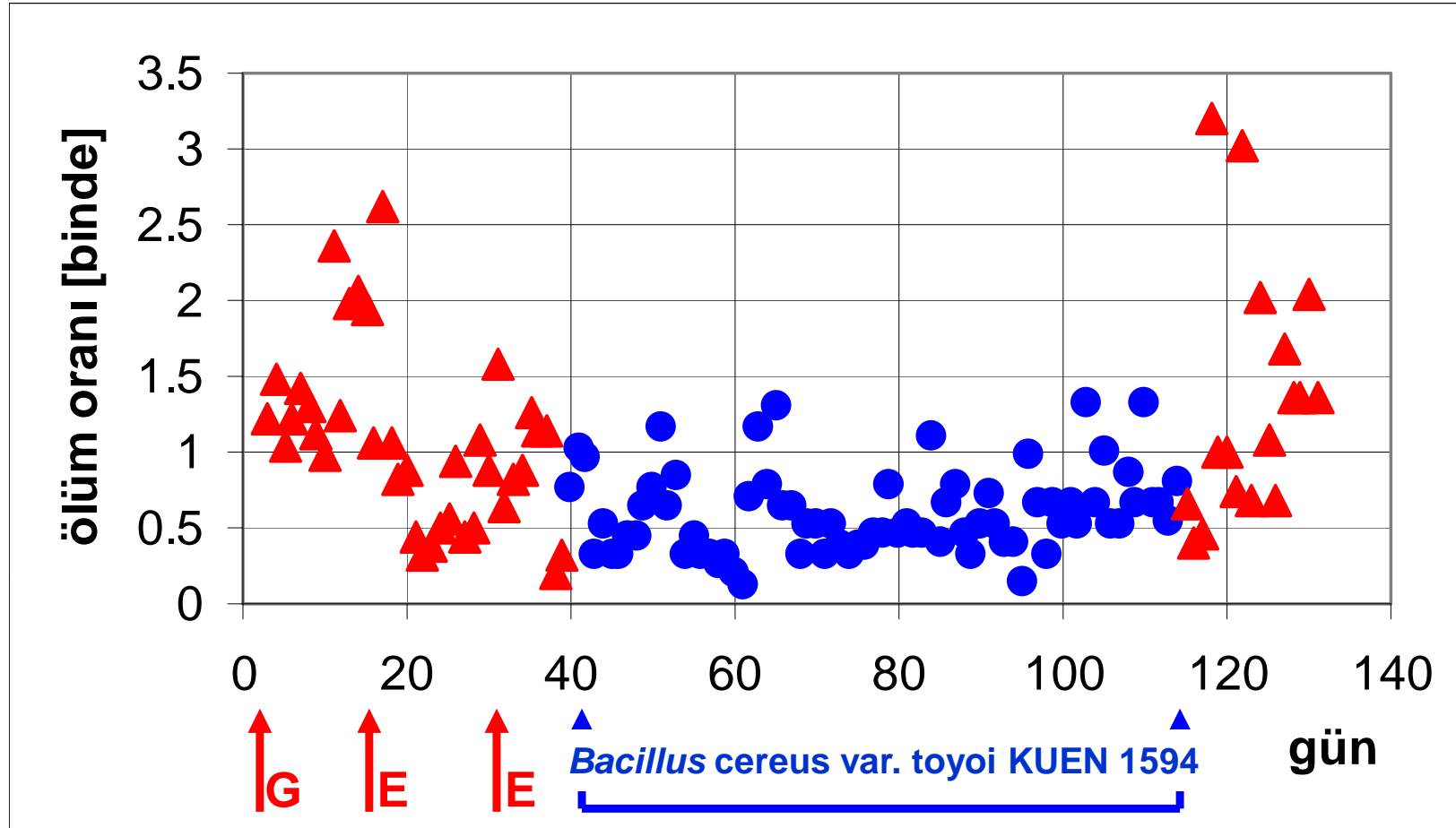
Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594 vs *Salmonella* spp. / *E. coli* Laboratuvar çalışmaları



Müller-Hinton besiyerine tavuktan izole edilmiş *Salmonella* spp. ve *E. coli* kültürleri yayılmış ve bunlar koloni oluşturduktan sonra üzerlerine noktasal *Bacillus cereus* var. *toyoi* KUEN 1594 ekilmiştir. *Bacillus cereus* kolonisi *Salmonella* ve *E. coli* varlığında büyümüş ve yayılmıştır.

Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594 vs *Salmonella* spp.

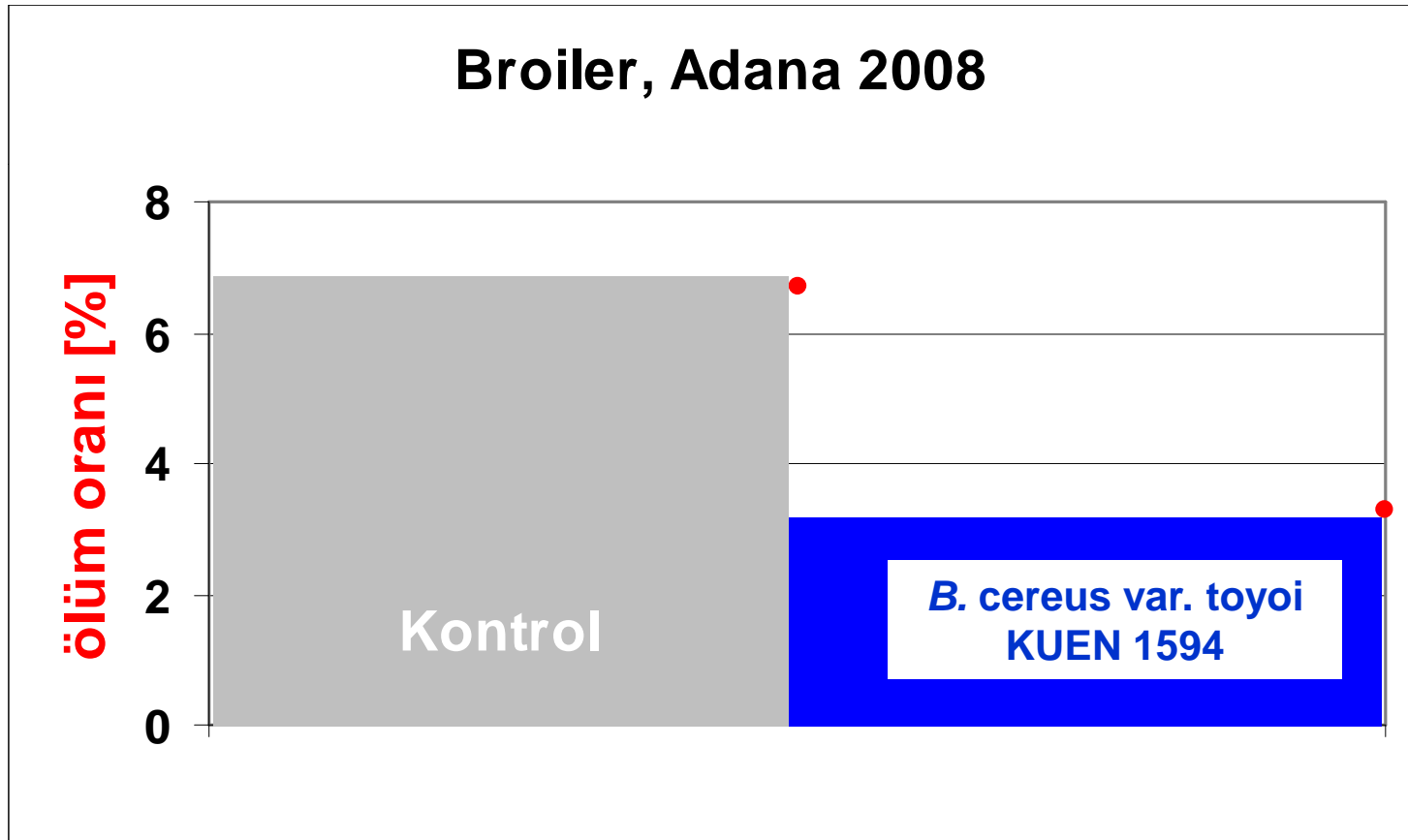
- Kronik *Salmonella* spp. enfekte kahverengi yumurtacı sürüsünde *Bacillus cereus* var. *toyoi* KUEN 1594 etkisi
- Nisan-Temmuz 2007, Bandırma, 84. haftada 16000 yumurtacı
- Tedavi:
 - G: Gentamisin iM enjeksiyon
 - E: Enrofloksasin, içme suyuna, 3 gün
- Alternatif: *Bacillus cereus* var. *toyoi* KUEN 1594, toz formülasyon yem katkısı dozaj 0,5 kg/ton yem



G: Gentamisin ve **E**: Enrofloksasin tedavileri neticesiz kaldıktan sonra *Bacillus cereus var. toyoi* KUEN 1594 0,5 kg/ton (89-100 hafta) uygulaması ile mortalite azalmış, probiyotik kesildikten sonra tekrar artmıştır.

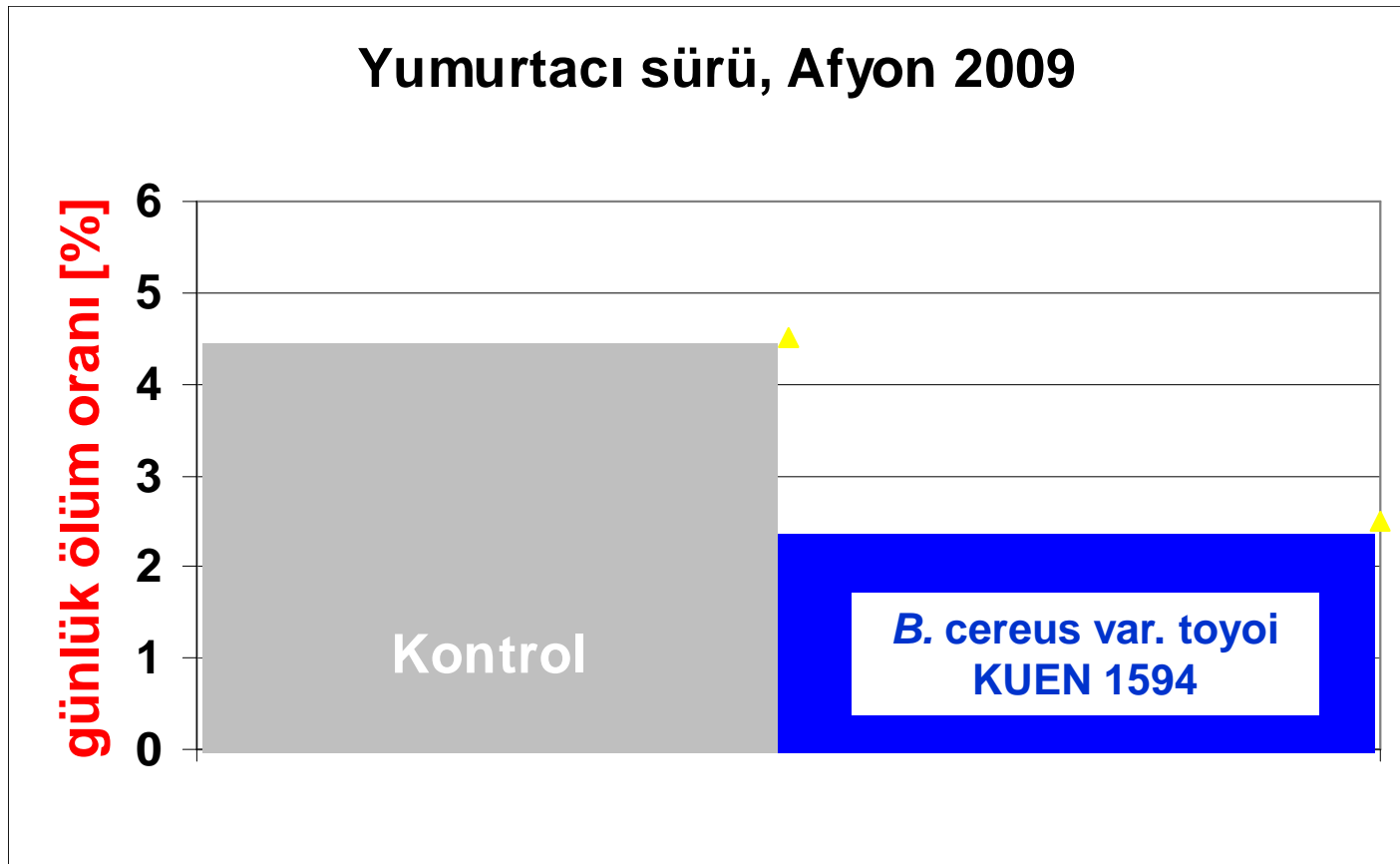
Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594 Mortalite

Adana, Ekim-Kasım 2008, Broiler, dozaj : 0-43. günler arasında civciv, piliç ve kesim öncesi yemlerinde 0,5 kg *Bacillus cereus* var. *toyoi* KUEN 1594 / ton yem



Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594 Mortalite

2x10000'lik 2 sürü. 10. haftadan başlayarak *Bacillus cereus* var. *toyoi* KUEN 1594 0.5 kg / t yem. Kontrol gurubuna probiyotik hariç aynı rasyon. 26-27 ve 28 . haftaların ortalama sonuçları:

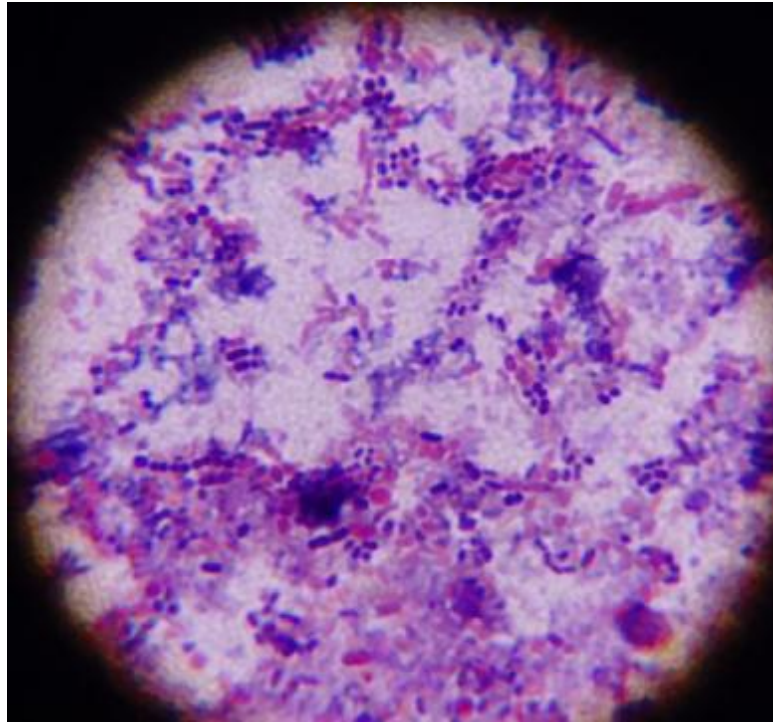


Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594

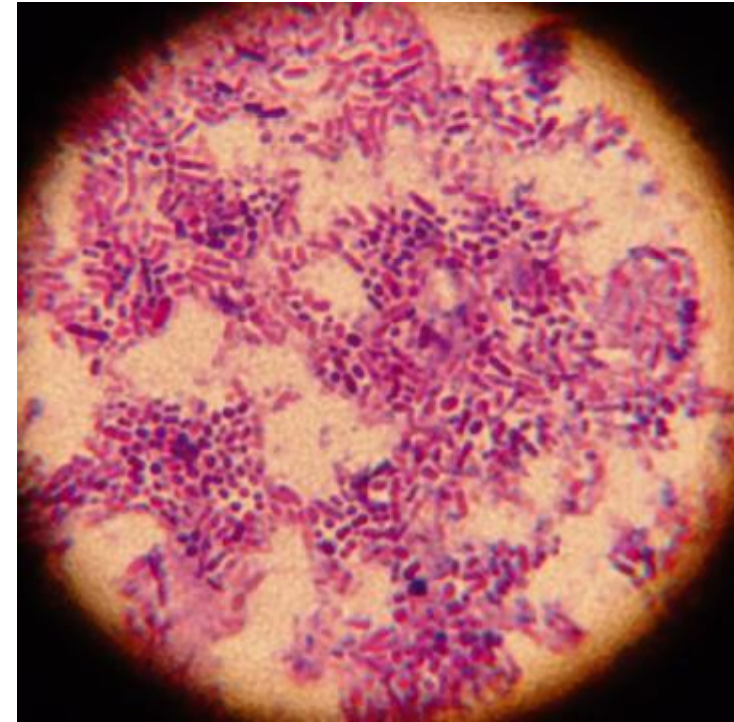
Dışkı kalitesi

Yumurtacı sürü, Adapazarı, 2009

İçmesuyuna 250 mL/t *B. cereus* sıvı formülasyon



B. cereus (maviler gram pozitif)



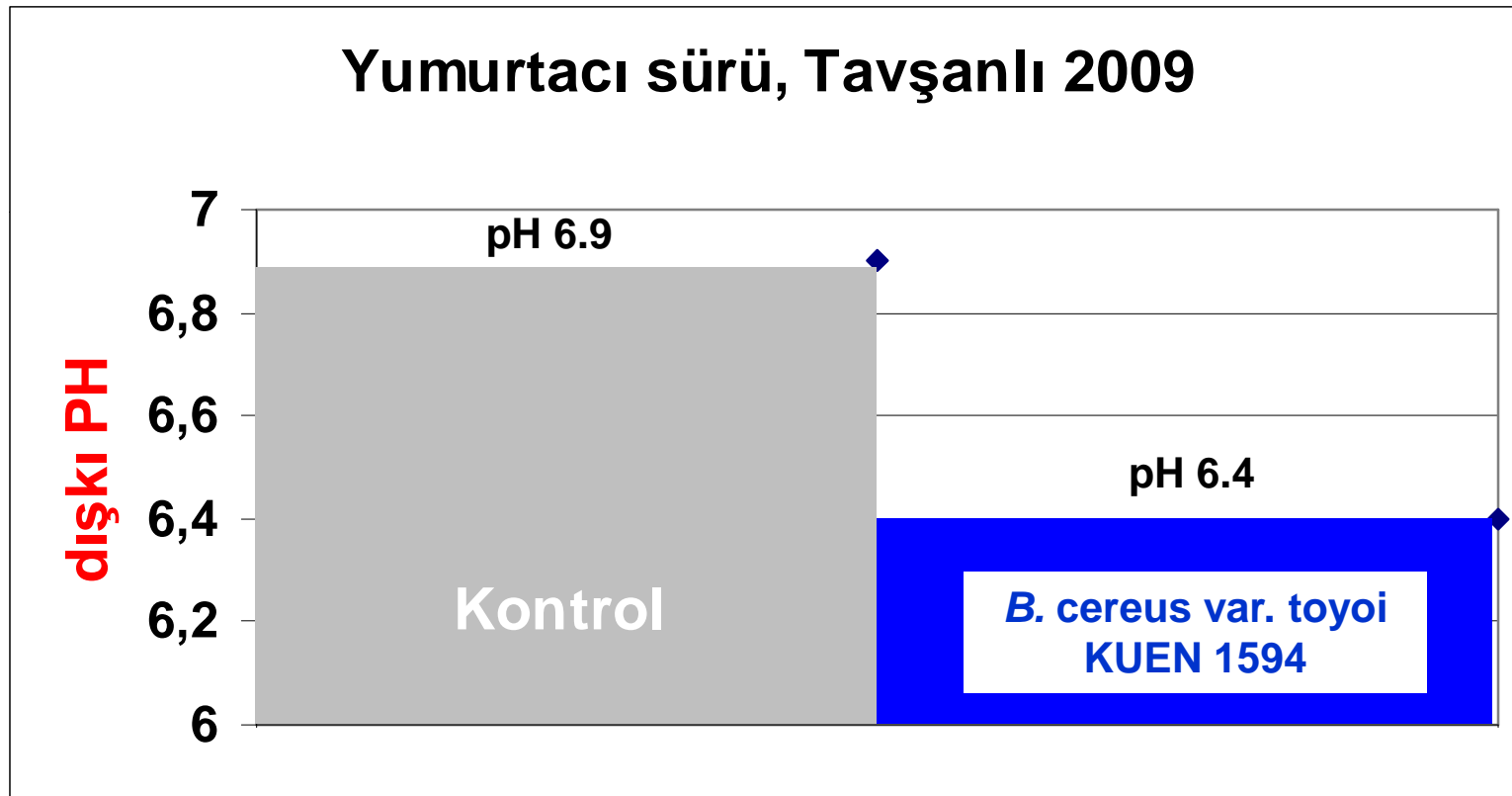
Kontrol (pembeler gram negatif)

Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594 ile dışkıda gram pozitif bakteriler artmış, gram negatif bakteriler azalmıştır.

Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594

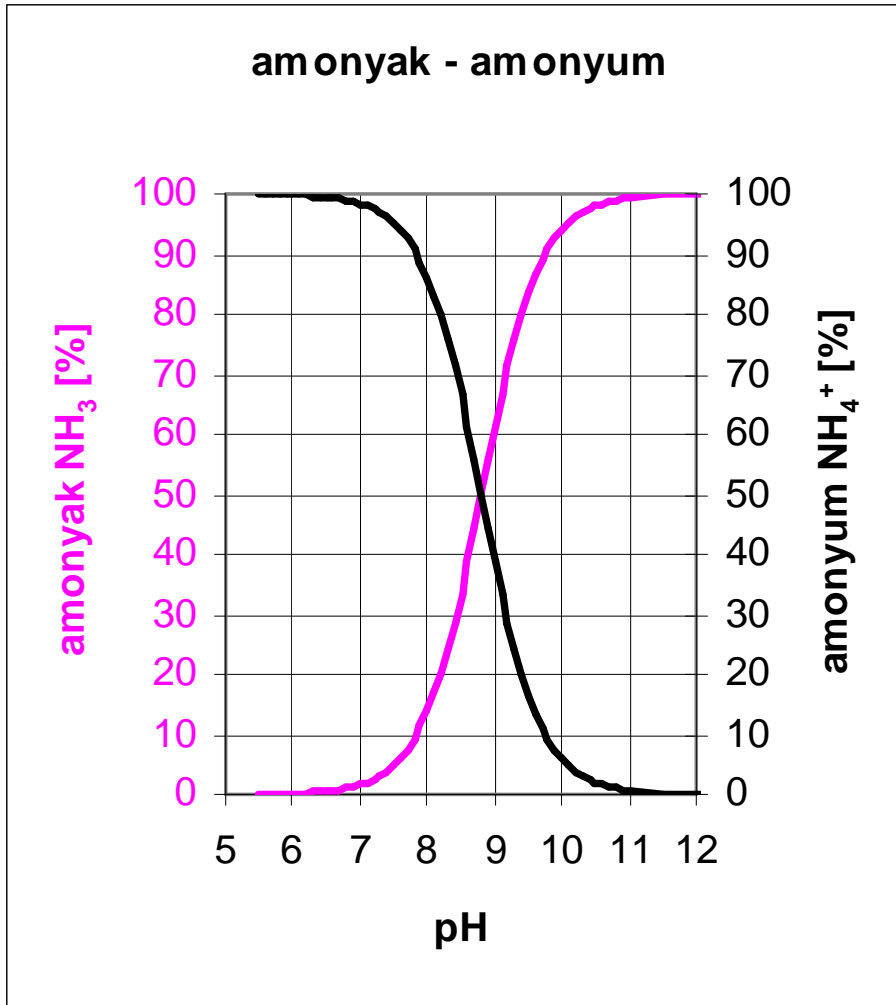
Dışkı kalitesi

içmesuyuna 250 mL/t *Bacillus cereus* var. *toyoi* KUEN 1594 sıvı formülasyon uygulaması



Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594

Dışkı kalitesi



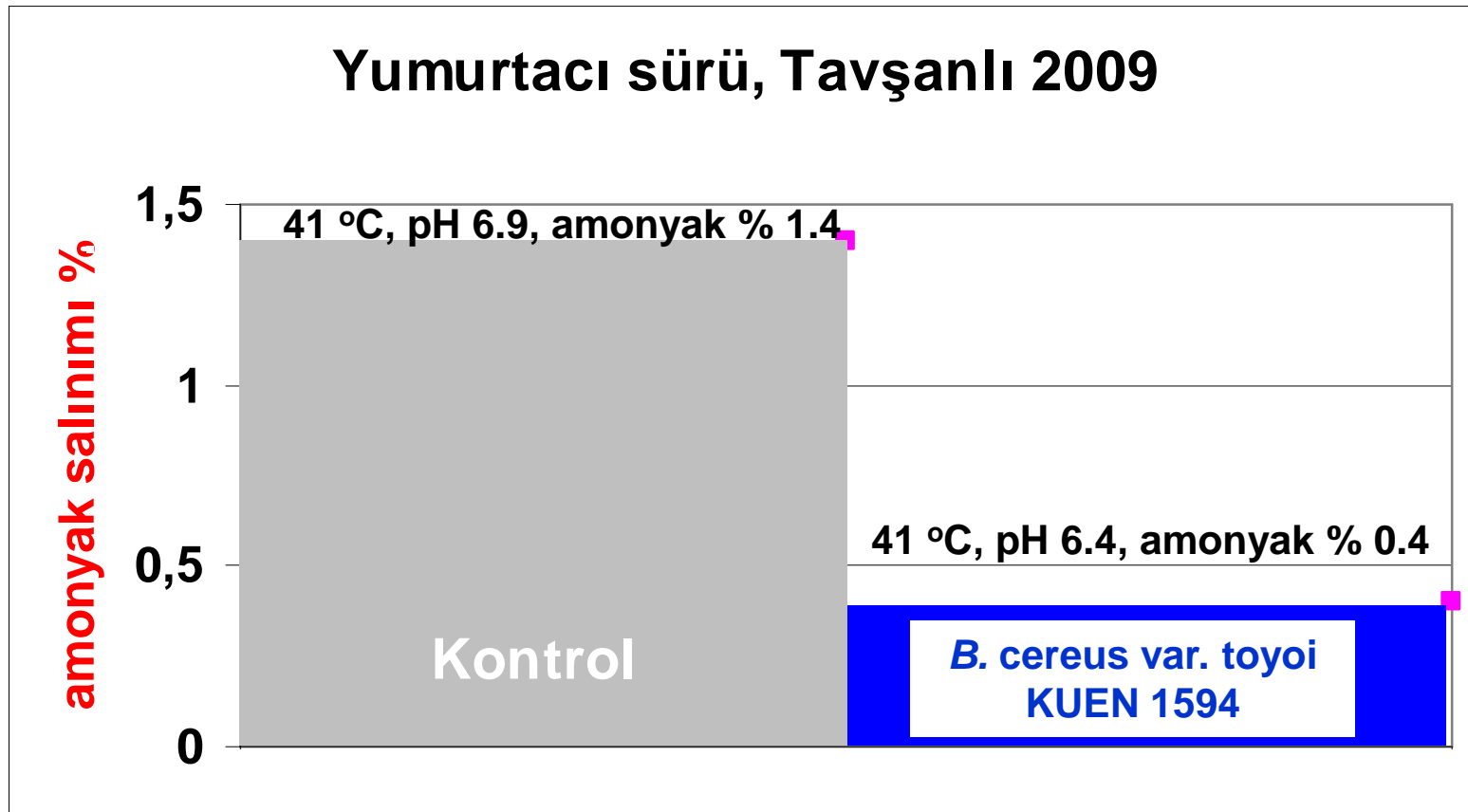
Dışkıdaki amonyak / amonyum dengesi pH'ya bağlıdır.

Yükselen pH ile denge amonyak tarafına kayar; sürekli amonyak gazı salınır.

Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594

Dışkı kalitesi

İçmesuyuna 250 mL/t *Bacillus cereus* var. *toyoi*
KUEN 1594 sıvı formülasyon uygulaması



Bacillus cereus var. *toyoi* KUEN 1594

Sonuçlar

- Dışkıda Gram + bakteriler artmakta, Gram - azalmaktadır
- Bağırsak florasında Gram negatif (muhtemel patojen) bakteriler baskılanmaktadır
- Bilhassa civcivlerin ilk günlerinde ve genç hayvanlarda, bağırsak floralarının hızla gelişmesini sağlayarak probiyotik etki yaratmakta ve ishalden dolayı ölümler azalmaktadır
- Dışkı pH'sı düştüğü için amonyak salımı azalmaktadır
- Islak dışkı ve ishal vakaları azalmaktadır
- Kuru altlık patojenlerin çoğalmasını engellemektedir
- Kanatlı et ve yumurtasının insan sağlığına daha yararlı bir şekilde üretilmesine yardımcı olmaktadır

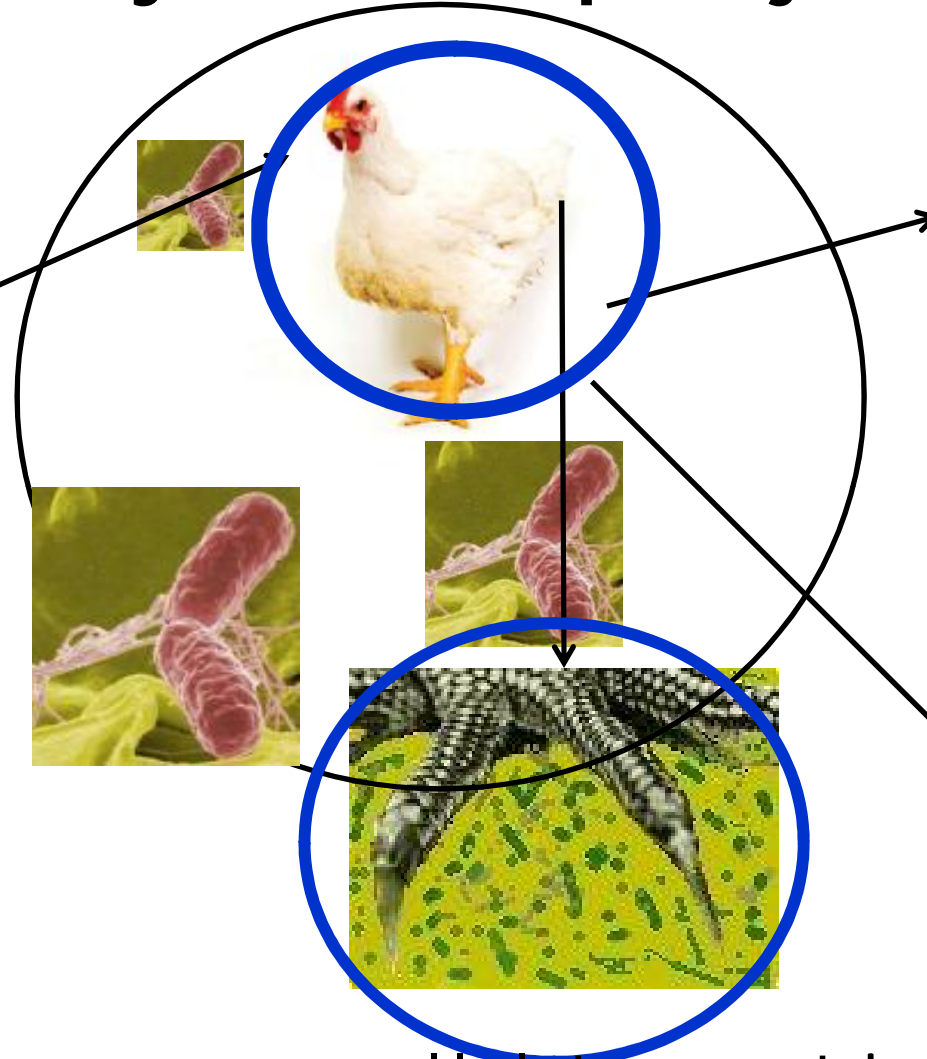


Mikroorganizmalarla Savaş

Paradigma 2

- Kanatlı yetiştiriciliğinde patojen bakteriler uygun ortamlarda (sindirim sistemi, altlık) çoğalmaktadır
- Biyogüvenlik: Patojen mikroorganizmaları engellemek gereklidir
- 'Faydalı' probiyotik bakterilerin ortamdaki (bağırsak / altlık) sayısını arttırarak patojenlere karşı koruma sağlanabilir
- Böylece doğal denge tekrar oluşur, insan sağlığına zararlı kalıntı sorunu da azalır

Probiyotiklerle patojen kontrolü



Civciv, yem, su ve zararlılarla taşınan patojenler (bakteri, küf) bağırsak ve altlık ortamlarında baskılanarak kontrol edilir



OKAN ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL

simbiyotek



Teşekkürler