

***Bacillus subtilis* içeren Küf ve Bakterilere karşı Koruyucu Biyosidal Ürün**

Şems Yonsel

Simbiyotek Biyolojik Ürünler San. ve Tic. A.Ş.

Okul C. 26/1, Orhanlı, Tuzla-İstanbul

www.simbiyotek.com yonsel@simbiyotek.com

1. Ulusal Biyosidal Kongresi 4-7 Kasım, Antalya

ÖZET

Bacillus subtilis, Biyosidal Ürünler Yönetmeliği, RG 31.12.2009/27449, EK-A Listesinde, veterinerlik hijyenine yönelik ürünler (Ürün Tipi 3) kapsamında tanımlanmış bir biyosidaldır. Simbiyotek A.Ş. tarafından izole edilen *Bacillus subtilis* KUEN 1581 suşu ile en az 2×10^9 KOB/g canlı hücre içeren bir formülasyon geliştirilmiştir. *Bacillus subtilis* KUEN 1581 doğal ortamda sıcaklık, nem, UV ışınları gibi koşullardan çok az etkilenmekte, canlılığını koruyabilmekte ve ancak yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılabilmektedir. Havasız ve havalı ortamlarda yapılan denemeler *Bacillus subtilis*'in hayvan barınaklarının altlık malzemelerindeki fungus ve diğer bakterileri baskıladığını göstermektedir. *Bacillus subtilis* uygulamaları ile altlıklarda kötü koku ve pH değerleri azalmakta, asitlik artmakta ve hayvan barınaklarında daha sağlıklı koşullar sağlanabilmektedir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus subtilis*, biyosidal ürün, hayvan barınakları, altlık

SUMMARY

Bacillus subtilis is a biocidal agent of Product-type 3: Veterinary hygiene biocidal products, according to DIRECTIVE 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market. A *Bacillus subtilis* strain isolated by Simbiyotek A.Ş. and stored at KÜKENS Culture Collection Centre as KUEN 1581 is used to develop a formulation with at least 2×10^9 CFU/g living cells. *Bacillus subtilis* KUEN 1581 is hardly effected by heat, moisture or UV in natural habitats, but can easily be removed by washing with water. Tests run in aerobic and anaerobic conditions show that *Bacillus subtilis* can repress fungi or other bacteria in bedding materials. Bad odours are eliminated and pH value is decreased so that better health conditions in animal housings can be achieved.

Key words: *Bacillus subtilis*, biocidal product, animal housings, beddings

GİRİŞ

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis *Bacillaceae* familyasının *Bacillus* cinsine ait toprak, su, hava ve çürüyen bitki artıklarından izole edilen ve her yerde bulunabilen bir bakteridir. Gram-pozitif, çürükçül bakteri *Bacillus subtilis* doğadaki besin döngüsüne katkıda bulunur. Büyüme genellikle oksijen olan ortamlarda olmasına rağmen nitrat varlığında havasız ortamlarda da gerçekleşebilir. Sıcak ve kurak evrelerde *Bacillus subtilis* endosporlar oluşturarak canlılığını koruyabilir. Endosporlar ısı, ışık, donma, kuruma, radyasyon gibi fiziksel faktörlere, dezenfektanlar ve kimyasal maddelere, mekanik etkilere karşı çok dayanıklıdır. *Bacillus subtilis* doğada genellikle spor formunda bulunur; ortam şartları uygunsa çimlenerek vegetatif forma geçer ve büyümeye başlar. Büyüme evresindeki metabolik faaliyetler süresince *Bacillus subtilis* çeşitli maddeler ve enzimler salgılar. Bu maddelerle *Bacillus subtilis* ortamdaki diğer mikroorganizmaları baskılayarak mevcut besin maddelerinden kendisi yararlanır ve çevresine hakim olur. Bu nedenle. *Bacillus subtilis* uzun yıllardır gıda, yem ve tarım sanayinde kullanılmaktadır.

Yönetmeliklerde *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis ülkemizde ve Avrupa Birliğinde geçerli çeşitli yönetmeliklerde kullanımına izin verilmiş bir mikroorganizmadır:

* YEM KATKI VE PREMİKSLERİN ÜRETİMİ, İTHALATI, İHRACATI, SATIŞI VE KULLANIMI HAKKINDA TEBLİĞ, RG 18.12.2002, EK-U Mikroorganizmalar

EU COUNCIL DIRECTIVE 70/524 of 23 November 1970, Concerning additives in feeding-stuffs, Annex 1 Micro-organisms

* TARIMDA KULLANILAN ORGANİK, ORGANOMİNERAL GÜBRELER VE TOPRAK DÜZENLEYİCİLER İLE MİKROBİYAL, ENZİM İÇERİKLİ VE DİĞER ÜRÜNLERİN ÜRETİMİ, İTHALATI VE PİYASAYA ARZINA DAİR YÖNETMELİK, RG 04.06.2010/27601, EK-5 Mikrobiyal gübreler

EU COUNCIL DIRECTIVE 91/414, Concerning the placing of plant protection products on the market, Annex I

* BİYOSİDAL ÜRÜNLER YÖNETMELİĞİ, RG 31 Aralık 2009/27449, EK-A ÜRÜN TİPİ TANIMLANMIŞ MADDELERİN LİSTESİ.

EU COUNCIL DIRECTIVE 98/8, Concerning the placing of biocidal products on the market, List of existing active substances used in biocidal products.

***Bacillus subtilis*'in çevre, bitki, hayvan ve insan sağlığı üzerindeki etkileri**

Bacillus subtilis endüstriyel mikrobiyolojide bilhassa gıda katkısı enzimler ve değişik kimyasal maddeler üretiminde son 20 yılda en sık kullanılan mikroorganizmalardan biridir. *Bacillus subtilis*'in çevre, insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmalara etkisi ABD'de Çevre Koruma Kurumunun (EPA) 1997 yılında ve AB'de Avrupa Komisyonu Sağlık ve Tüketici Koruma Genel Müdürlüğü'nün 2006 yılında yayınladıkları iki Nihai Risk Raporunda etraflıca irdelenmiş ve zararlı olmadığı hükmü verilmiştir:

1. *Bacillus subtilis* Final Risk Assessment, EPA, February 1997.
2. Review report for the active substance *Bacillus subtilis*, EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 14 July 2006

Endüstriyel mikrobiyolojide enzim ve gıda üretiminde kullanılan *B. subtilis*'in küresel dağılımı ve toksik olmayan karakteri nedeni ile uygulama yapılan alanlarda sağlık veya çevresel etki görülmemektedir [EC 2006]. *B. subtilis*'in insanlarda patojenik veya toksik etkisi yoktur; insan vücuduna yerleşerek kolonize olmaz [Edberg, S.C. 1991; EC 2006]. *B. subtilis* bitkiler için patojenik değildir [Claus, D. and R.C.W. Berkeley 1986]. Hayvanlarda, *B. subtilis* hastalık yapan bir etmen olarak saptanmamıştır [Logan, N.A. 1988]. *B. subtilis* doğal antibakteriyal ve antifungal maddeler üretmektedir [Katz, E. and A.C. Demain. 1977; Korzybski, T., et al. 1978]. *Bacillus subtilis* bu özelliklerinden dolayı gıda, hayvancılık ve tarım sektörlerinde kullanılmaktadır.

***Bacillus subtilis* içeren ürünler**

Bacillus subtilis, yem yönetmeliklerine göre ruhsatlı ürünlerde probiyotik yem katkısı olarak kullanılmaktadır. *B. subtilis* tarım sektöründe biyokontrol ajanı olarak çeşitli fungal bitki patojenlerine karşı kullanılmaktadır [McKeen C.D. et al., 1986, [Kimura, N. and S. Hirano. 1988, Loeffler W. et al., 1986)].

Gıda teknolojisinde kullanılan birçok enzim *Bacillus subtilis*'ten elde edilmektedir. Bundan başka doğal *Bacillus* kültürleri soya sosu üretiminde kullanılmaktadır: [Codex Alimentarius, CODEX STAN 298R-2009, Standard for fermented soybean paste].

Biyosidal Ürünler Yönetmeliği, EK-A Listesinde *Bacillus subtilis* veteriner hijyenine yönelik biyosidal ürünler (Ürün Tipi 3) kapsamında tanımlanmıştır. AB ülkelerinde ruhsatlı olan bu tür ürünler hayvan barınaklarındaki zemin ve altlıklarda kompost süreçlerinin iyileştirilmesi, koku giderimi, amonyak emisyonlarının azaltılması, patojen mikroorganizmaların baskılanması, hayvanlar için daha sağlıklı bir ortam oluşması amacı ile kullanılmaktadır (www.cobiotex.fr).

***Bacillus subtilis* KUEN 1581**

Simbiyotek A.Ş. tarafından doğadan izole edilip KÜKENS (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Merkezi) Kataloğunda KUEN 1581 numarası ile kayıt altına alınan bir *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak hayvan barınaklarında zemin ve altlıkların kalitesini iyileştiren biyosidal bir ürün geliştirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Bakteri canlı hücre sayımı

Bakteriler için Plate Count Agar (PCA) ortamı kullanılmıştır [U.S. Food and Drug Administration, Chapter 3 Aerobic Plate Count, January 2001]. 1 L steril suya; 5 g Tryptone, 2,5 g maya özütü, 1 g Dekstroz, 15 g Agar tartılır, kaynar suda eritilir, otoklavda 121°C'de 30 dakika steril edilir, 50°C'ye soğutulur ve petrilere dökülür. Sayım amaçlı yapılan ekimlerde, her bir petriye uygun seyreltilen 100 mL örnek koyularak cam bagetle yayılır. PCA petrilere 30-37 °C'de 48-72 saat inkübe edilir; inkübasyon süresi sonunda petrilere oluşan koloniler sayılır ve hesaplanır.

Bacillus subtilis, petrileredeki kolonilerin özgün morfolojisine göre tanımlanmıştır. *Salmonella* spp. tayini T.C.Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bursa Gıda Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsünde, BAM 2002, 2007 metoduna göre yaptırılmıştır.

Fungus canlı hücre sayımı

Funguslar için Potato Dextrose Agar (PDA) ortamı kullanılmıştır [DIFCO Manual, p:6]. Koloni sayımında PDA ortamına, %0,15 Safra tuzu [Ş.Topal, M., Batum ve ark.. Turkish Journal of Biology, 24: 79-93, 2000] ve 100 mg/mL Oxytetracycline [Selective Mikrobiology for Food & Dairy Laboratories, OXOID, p30] ilave edilir. PDA petrilere 26-28 °C'de 48-72 saat inkübe edilir [Topal, Ş. ve ark. Turkish Journal of Biology, 24: 79-93, 2000], inkübasyon süresi sonunda petrilere oluşan koloniler sayılır ve hesaplanır.

Örnek hazırlama

Altık v.b. malzemelerden alınan örnekler küçük parçalara bölünerek tampon çözeltisi içine verilir, sallayıcıda karıştırıldıktan sonra uygun seyreltmeler yapılarak PCA/ PDA besi ortamlarına yayma yöntemi ile ekim yapılır

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.

Fermentasyon ve formülasyon

Simbiyotek A.Ş. tarafından yürütülen bir TÜBİTAK-TEYDEB KOBİ Ar-Ge Destek Programı Projesi kapsamında *Bacillus subtilis* ile laboratuvar boyutunda fermentasyon protokolleri çalışıldıktan sonra pilot boyutta (50 L) fermentasyonlar yapılmış ve boyut büyütme aşamasına geçilmiştir. Üretim boyutunda (8000 L) yapılan fermentasyonlarda optimum üretim protokolleri saptanmış, hedeflenen asgari canlı hücre adedi 10^9 KOB/mL ve % 80 spor oranına erişilmiştir. Geliştirilen formülasyonla yapılan raf ömrü testlerinde oda sıcaklığında 6 ay sürede %50'den daha az canlı hücre kaybı (KOB/mL) olduğu saptanmıştır.

Asgari 2×10^9 KOB/g *Bacillus subtilis* sporu içeren sıvı formülasyon çeşitli denemelerde kullanılmış, doğada canlılık ve kullanılacağı ortamlarda etkinlik parametreleri sınanmıştır.

ETKİNLİK DENEMELERİ

1. Öngörülen kullanım alanları ve uygulama metodları

Hayvan barınaklarında zemin ve altlıklarda gübre birikmesi kötü koku, amonyak emisyonu, patojen mikroorganizmaların çoğalması gibi hayvan sağlığını bozucu sorunlara yol açmaktadır. *Bacillus subtilis* zemin ve altlıklarda küf ve bakterilere karşı koruyucu, pH düşürücü ve amonyak emisyonunu azaltıcı olarak kullanılabilir.

Bacillus subtilis sporları uygulandıktan sonra ortamda hızla çimlenir ve çoğalır. *Bacillus*'un metabolik faaliyeti neticesinde pH değeri azalır ve amonyumun amonyak gazı formuna dönüştüğü pH değerinin altına inilerek amonyak emisyonu engellenir. Böylece kötü kokuda azalma olur. pH değerinin azalması ve *Bacillus subtilis*'in ürettiği bakteriyositlerle birçok patojen mikroorganizma baskılanır, küflerin gelişmesi engellenir. Ortam hayvanların sağlıklı yaşamalarına daha elverişli bir hale gelir.

Hayvan barınaklarında zemin veya cisimlerin yüzeylerine asgari 2×10^9 KOB/g *Bacillus subtilis* sporu içeren formülasyon %2 oranında suyla seyreltilerek hazırlanan çözelti yüzeyi kaplayacak şekilde fırçalama, püskürtme, veya daldırma yöntemi ile uygulanabilir.

Hayvan barınaklarında altlıklar için 1 L, asgari $2 \cdot 10^9$ KOB/g *Bacillus subtilis* sporu içeren formülasyon, 10 L su ile seyreltilir, 250-500 m² alana püskürtülerek uygulanabilir.

2. *Bacillus subtilis* in vivo stabilite testleri

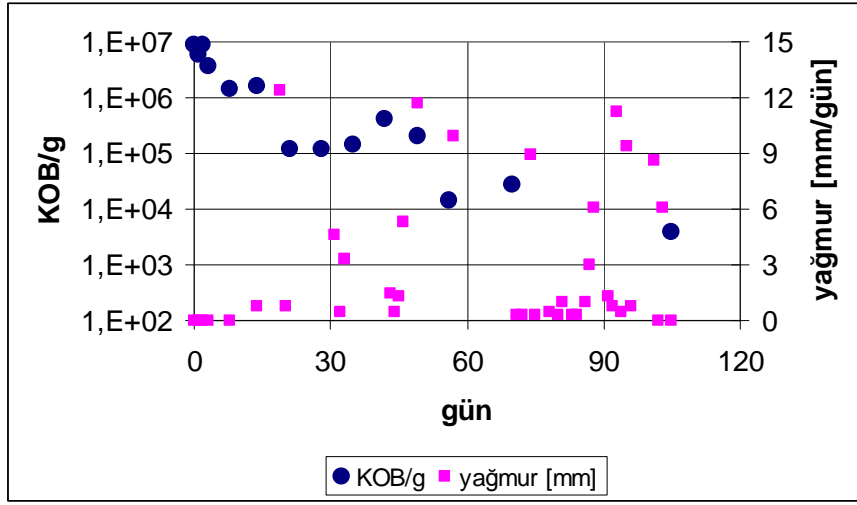
Bacillus subtilis'in güneş, yağmur, v.s. gibi iklim koşullarına maruz bırakıldığında ne kadar süre canlı kaldığını saptamak amacıyla deney yapılmıştır. Deney bitkisi olarak Ortanca seçilmiştir. Bunun sebebi yaprak yüzeyinin düz, geniş ve sık sık numune alınması gerektiği için yeterli yaprak sayısına sahip olmasıdır. Alınan örneklerden yapılan sayımlar KOB/g olarak hesaplanmıştır.

Uygulamaya başlamadan önce yaprak numunelerinde bakteri sayımı yapılmış ve $1,3 \cdot 10^3$ KOB/g değeri bulunmuştur. Uygulamada $3 \cdot 10^9$ KOB/g *Bacillus subtilis* içeren formülasyon %2 oranında suya karıştırılmış, yapraklara püskürtülerek uygulanmıştır. Uygulama sonucunda yapraklarda $6-9 \cdot 10^6$ KOB/g mertebelerinde *Bacillus subtilis* bulunmuştur. Bu değerler hedeflere uygundur. Uygulama yapılan bitkilerden belirli aralıklarla bakteri sayımı için numune alınmıştır.

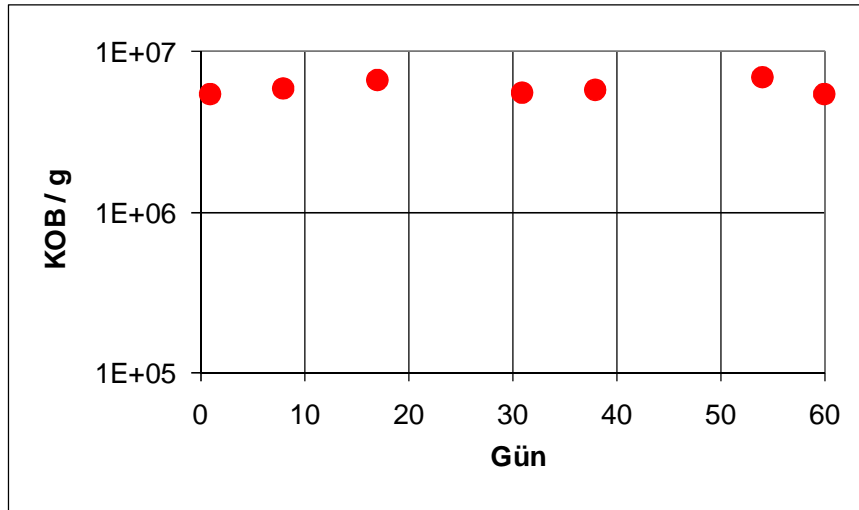
Şekil 1, 105 gün süren denemenin sonuçlarını vermektedir. Şekilde denemenin yaklaşık 20., 50. ve 100. günlerinde *Bacillus subtilis* sayılarının yaklaşık birer mertebe düştüğü görülmektedir. Denemenin yapıldığı sürenin meteorolojik verileri (yağış, sıcaklık, rüzgar v.d.) bu gözlemlerle karşılaştırılmış ve yağmurun etkili olduğu saptanmıştır. Şekilde günlük yağış verileri de verilmiştir. Deneme süresinde üç kez ani ve etkili yağışlar görülmüş, yağış miktarları günde 12 mm'ye ulaşmıştır. Bu sağanaklardan sonra yapılan analizlerde *Bacillus subtilis* sayımlarının yaklaşık bir mertebe düştüğü saptanmıştır.

Yağış etkisinin olmadığı sera ortamında buğday bitkisinde bir deneme yapılmıştır. Buğday yapraklarına *Bacillus subtilis* formülasyonu %2 oranında suyla seyreltilerek hazırlanan çözelti püskürtülerek uygulanmıştır. Yapraklarda yapılan analizler, *Bacillus subtilis* sayılarının 2 aylık sürede aynı mertebede ($5-6 \cdot 10^6$ KOB/g) kaldığını göstermektedir (Şekil 2).

Sonuç olarak *Bacillus subtilis* sıcaklık, nem, UV ışınları gibi ortam koşullarından çok az etkilenmekte ve canlılığını koruyabilmekte ancak yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılabilmektedir.



Şekil 1 Ortaça yapraklarında *Bacillus subtilis* in vivo canlılık denemesi



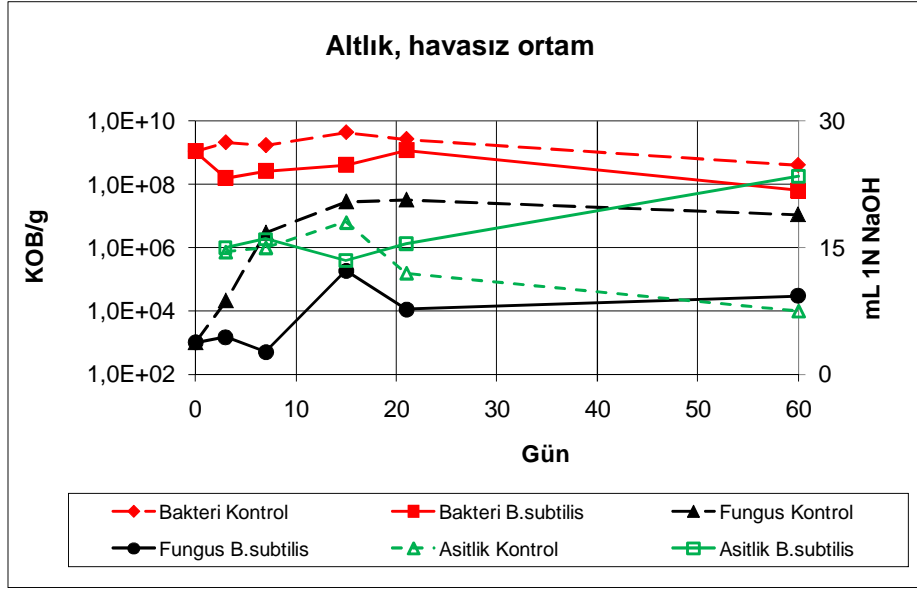
Şekil 2 Sera ortamında buğday yapraklarında *Bacillus subtilis* in vivo canlılık denemesi

3. Havasız ortamda altlık materyaline *Bacillus subtilis* uygulaması

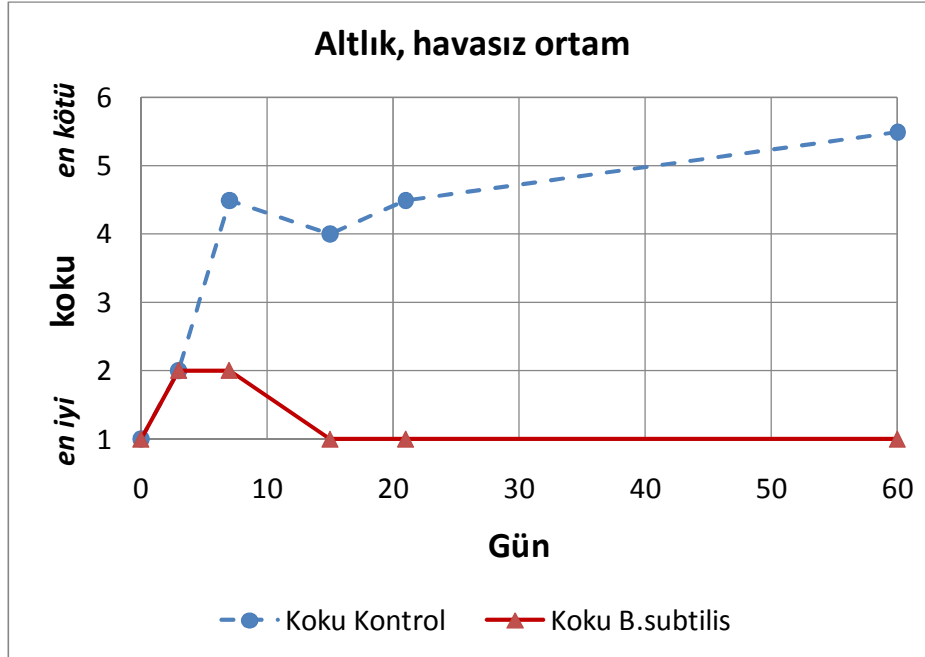
Hayvan barınaklarındaki altlık materyalinde bakteri faaliyeti ve sıkışmadan ötürü oksijensiz bölgeler oluşabilmektedir. Havasız ortamda meydana gelen metabolik faaliyetlerde amonyak açığa çıkar ve kötü kokulu gazlar oluşur. *Bacillus subtilis*'in havasız ortamlarda etkinliğini incelemek için denemeler yapılmıştır.

Islak altlık malzemesine benzetim amacı ile denemede taze biçilmiş ot kullanılmıştır. 5 mL, 3 10⁹ KOB/g *Bacillus subtilis* içeren formülasyon 500 mL suya tamamlanmış ve 2'şer kg ot materyaline püskürtülerek

uygulanmıştır. Kontrole aynı miktarda su püskürtülmüştür. Örnekler 2'şer kg olarak ayrı ayrı plastik torbalara doldurulmuş ve sıkıca sarılarak paketlenmiştir. Kısa süre sonra içerisinde havasız bir ortam oluşan paketler ortam sıcaklığında saklanmış, belirli günlerde birer paket açılarak mikrobiyolojik analizler ve 1 N NaOH ile asit titrasyonu yapılmıştır.



Şekil 3 Havasız ortamda Kontrol ve *Bacillus subtilis* uygulanan altlık paketlerinde bakteri ve fungus sayımları ve asitlik değerleri



Şekil 4 Havasız ortamda Kontrol ve *Bacillus subtilis* uygulanan altlık paketlerinde koku oluşumu

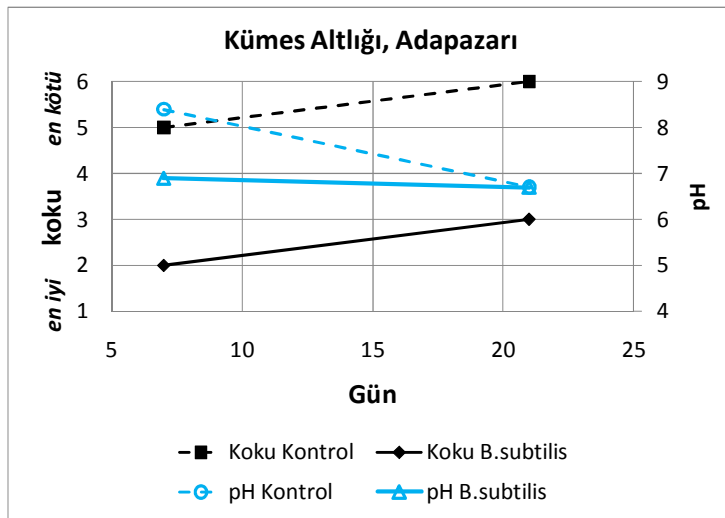
Kontrol altlık paketlerindeki fungus sayımları deneme süresince *Bacillus subtilis* uygulanan örneklere nazaran yaklaşık 10 misli daha yüksek değerlerde seyretmiştir. Aynı şekilde bakteri sayımları da kontrolde yaklaşık 2 misli daha yüksek bulunmuştur. *Bacillus subtilis* uygulanan örneklerdeki asitlik deneme sonunda kontrole göre 3 misli daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre *Bacillus subtilis* havasız ortamda fungus ve diğer bakterileri baskılamaktadır (Şekil 3).

Kontrol paketlerindeki altlık materyali deneme süresi ilerledikçe daha kötü kokular oluşturmuş, *Bacillus subtilis* uygulanan paketlerin kokusu ise deneme sonuna doğru daha hoş olmuştur. *Bacillus subtilis* havasız ortamlarda laktik asit üreten bakterilerin gelişimini desteklemektedir. *Bacillus subtilis* uygulamasında ölçülen yüksek asitlik değerleri de bu olgunun bir kanıtıdır.

4. Kümes altlığında *Bacillus subtilis* uygulamaları

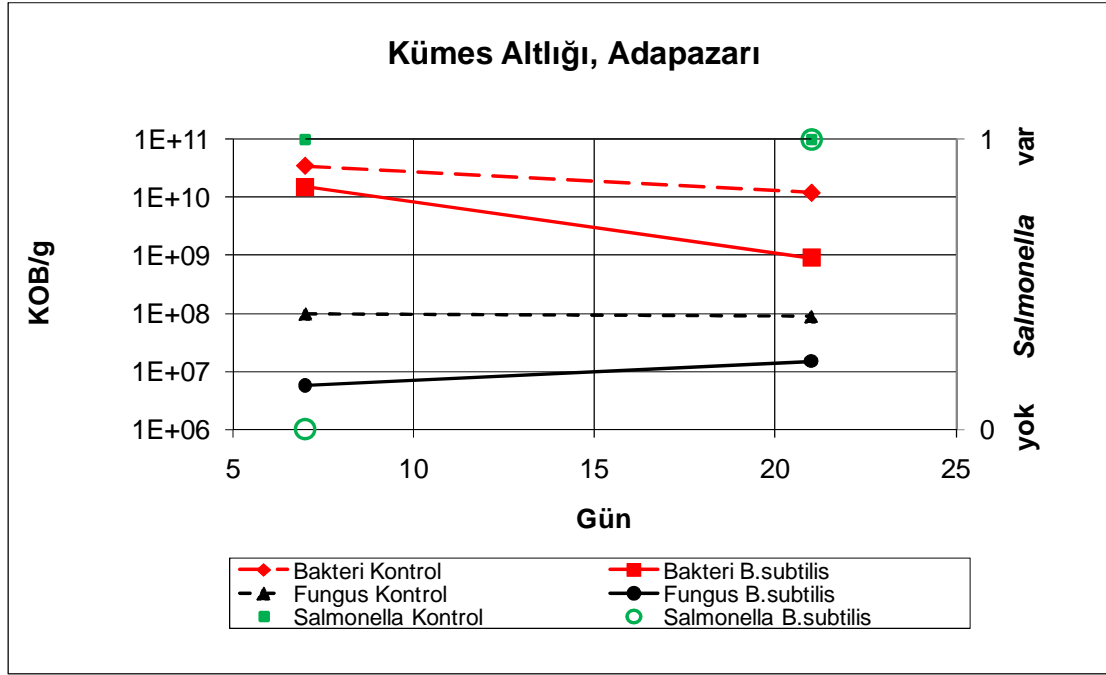
Kavuz ve çeltik türü kümes altlıklarına uygulanan *Bacillus subtilis*'in bu ortamlarda oluşan küf ve bakterilerin üzerindeki etkilerini araştırmak hedefi ile Adapazarı bölgesinde bir üretici kümesinde denemeler yapılmıştır.

Denemede 2×10^9 KOB/g *Bacillus subtilis* 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. Analiz Parametreleri: koku, pH, mikroorganizma sayımları ve tür tayinleridir (*Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, diğer bakteriler ve fungus). Örnekler uygulamadan sonraki 7. ve 21. günlerde alınmıştır.



Şekil 5 Kontrol ve *Bacillus subtilis* uygulanan kümes altlıklarında koku ve pH seyri

Kötü koku deneme süresince artmıştır. Kontrol keskin bir kokuya sahipken, *Bacillus subtilis* uygulanmış altlık daha az kokmaktadır. pH değerleri *Bacillus subtilis* uygulanan altlıkta kontrole göre daha düşüktür (Şekil 5).



Şekil 6 Kontrol ve *Bacillus subtilis* uygulanan kümes altlıklarında bakteri ve fungus sayımları.

Tablo 1 Kümeste Kontrol ve *Bacillus subtilis* uygulanan altlıklarda Fungus, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* spp.ve diğer bakteriler [KOB/g]

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

Şekil 6 ve Tablo 1'de verildiği gibi denemenin 7. gününde *Bacillus subtilis* uygulanmış altlıkta bakteri ve fungus sayıları kontrole göre daha düşüktür. *Bacillus subtilis* uygulanan altlıkta sadece *Bacillus subtilis* bulunmuş, diğer bakteriler tespit edilememiştir. 25 g numunede yapılan sayımlarda *Salmonella* spp. Kontrolde bulunmuş ancak *Bacillus subtilis* uygulanan altlıkta bulunmamıştır.

21. gün sonuçlarına göre *Bacillus subtilis* uygulanan altlıkta fungus ve bakteri sayımları kontrole göre daha düşük bulunmuştur. Ancak 21. günde *Bacillus subtilis* uygulanan altlıkta *Bacillus subtilis*

bulunamamış, kontrole göre yaklaşık bir merteye daha düşük bakteri saptanmıştır. Yine 25 g numunede yapılan sayımlarda *Salmonella* spp. Kontrolde ve *Bacillus subtilis* uygulanan altlıkta bulunmuştur.

Elde edilen bu sonuç *Bacillus subtilis*'in diğer mikroorganizmaları baskıladığını göstermektedir. Ancak deneme süresinde altlığa sürekli taze gübre eklendiği için *Bacillus subtilis*'in koruyucu etkisi azalmakta ve diğer bakteriler ortama tekrar hakim olmaya başlamaktadırlar. Bu nedenle kümes altlıklarında *Bacillus subtilis* uygulamalarının yukarıda verilen dozda 7-10 günde bir tekrarlanması tavsiye edilebilir.

SONUÇLAR

Biyosidal Ürünler Yönetmeliği, RG 31.12.2009/27449, EK-A Listesinde *Bacillus subtilis*, veterinerlik hijyen ürünleri (Ürün Tipi 3) kapsamında tanımlanmıştır. Simbiyotek A.Ş. tarafından izole edilerek geliştirilen *Bacillus subtilis* KUEN 1581 suşundan elde edilen, en az 2×10^9 KOB/g canlı hücre içeren formülasyonun canlılık ve etkinlik denemeleri yapılmıştır.

Bacillus subtilis doğal ortamda sıcaklık, nem, UV ışınları gibi koşullardan çok az etkilenmekte, canlılığını koruyabilmekte ve ancak yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılabilmektedir.

Havasız ve havalı ortamlarda yapılan denemeler, *Bacillus subtilis*'in altlık malzemelerindeki fungus ve diğer bakterileri baskıladığını göstermektedir. Bundan başka altlıklarda kötü koku ve pH değerleri azalmakta, asitlik artmaktadır. Böylece hayvan barınaklarında daha sağlıklı koşullar sağlanabilmektedir.

KAYNAKÇA

EPA, *Bacillus subtilis* Final Risk Assessment, February 1997, http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm

EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, Review report for the active substance *Bacillus subtilis* QST 713, Finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 14 July 2006 in view of the inclusion of *Bacillus subtilis* in Annex I of Directive 91/414/EEC.

Edberg, S.C. 1991. US EPA human health assessment: *Bacillus subtilis*. Unpublished, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C

Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, pp. 1105-1139. In: P.H.A. Sneath, et al. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD

Logan, N.A. 1988. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. *J. Med. Microbiol.* 25:157-165

Katz, E. and A.C. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41:449-474.;

Korzybski, T., et al. 1978. Antibiotics isolated from the genus *Bacillus* (Bacillaceae), pp. 1529-1661. In: Antibiotics - Origin, Nature and Properties, Vol. III. American Society of Microbiology, Washington, DC

McKeen C.D. et al., 1986 Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola*. *Phytopathol.* 76(2):136-138

Kimura, N. and S. Hirano. 1988. Inhibitory strains of *Bacillus subtilis* for growth and aflatoxin production of aflatoxigenic fungi. *Agric. Biol. Chem.* 52(5):1173-1179

Loeffler W. et al., Antifungal effects of bacilylsin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115(3):204-213. 1986