

Sodyum laktatın *Bacillus cereus* 'un büyüme kinetiği üzerindeki etkisi

Hülya ÖLMEZ*, Necla ARAN

İTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Bu çalışmada, sıcaklık, pH, sodyum laktat ve sodyum klorür konsantrasyonlarının *Bacillus cereus* 'un lag fazı süresi (LAG) ve çoğalma hızı (GR) üzerindeki etkisini ifade eden matematiksel modeller oluşturulmuştur. *B. cereus* için LAG ve GR değerlerini hesaplamak amacıyla Gompertz fonksiyonu kullanılmıştır. Bu kinetik parametreler, polinomal model kullanılarak bağımsız değişkenlere bağlı olarak ifade edilmiştir ve bağımsız değişkenlerin çoğalma parametreleri üzerindeki etkilerini gösteren üç boyutlu grafikler çizilmiştir. Çalışmanın sonuçları, sodyum laktatın antimikrobiyal aktivitesinin büyük oranda pH'dan ($p \leq 0.05$), daha düşük oranda ise sıcaklıktan ($p \leq 0.05$) etkilendiğini göstermiştir. Sodyum klorürün, sodyum laktatın etkinliği üzerinde bir etkisi bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus cereus*, çoğalma kinetiği, laktat, sıcaklık, pH, sodyum klorür.

Effect of sodium lactate on the growth kinetics of *Bacillus cereus*

Abstract

Models describing the lag phase duration (LAG) and growth rate (GR) of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations were obtained in this study. Gompertz function was used to calculate the LAG and GR of *B. cereus*. These parameters were expressed as a function of the independent variables using the polynomial models. In order to obtain a residual distribution closer to a normal distribution, the natural logarithm of the growth kinetic parameters were used in modeling. For reasons of parsimony, the polynomial models were reduced to contain only the coefficients significant at a level of $p \leq 0.05$. Using the reduced polynomial models (R^2 of 95.2 and 93.9 for ln LAG and ln GR models, respectively), three dimensional response surface graphs were drawn illustrating the effects of the independent variables on the growth parameters. Results of the modeling study indicated that all of the studied factors had a significant affect on the growth of *B. cereus* in the experimental range studied. The antimicrobial activity of sodium lactate was found to be strongly affected by the pH ($p \leq 0.05$) and relatively to a lesser extent by temperature ($p \leq 0.05$). Antimicrobial activity involved both prolonged lag phase duration and reduced growth rate. No effect of sodium chloride was found on the antimicrobial activity of sodium lactate.

Keywords: *Bacillus cereus*, growth kinetics, lactate, temperature, pH, sodium chloride.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Hülya ÖLMEZ. Hulya.Olmez@posta.mam.gov.tr; Tel: (262) 641 23 00 dahili: 3554.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi'nde tamamlanmış olan "Modeling the growth kinetics of *Bacillus* as a function of temperature pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 19.03.2004 tarihinde dergiye ulaşmış, 13.05.2004 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.10.2005 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Giriş

Bacillus cereus çubuk şeklinde, Gram-positif, spore oluşturan aerobik bir bakteridir (Dufrenne vd., 1995; Granum, 1994). Yaygın olarak süt ve süt ürünleri, et, baharatlar, kurutulmuş gıdalar, tahıllar, pirinç ve yumurtada bulunur. *B. cereus*, gıdalarda normal olarak bulunduğu düşük seviyelerde bir tehlike oluşturmaz. Ancak, özellikle 10-50°C sıcaklık aralığında muhafaza edilen pişmiş gıdarda kısa sürede toksin üretir ve çok yüksek seviyelere ulaşabilir (Granum, 1994). Bu nedenle *B. cereus*, gıda güvenliği açısından önemle üzerinde durulan bir bakteridir.

Çeşitli çalışmalarda *B. cereus*'un çoğalma kinetiği üzerine özellikle sıcaklık, pH ve sodyum klorürün etkisi ele alınmıştır (Choma vd., 2000; Chorin vd., 1997; Quantivalla ve Parolari, 1993). Ancak bugüne kadar *B. cereus* ile ilgili olarak yapılan modelleme çalışmalarının hiçbirinde laktatın bu bakterinin çoğalması üzerindeki etkisi incelenmemiştir. Potasyum-, kalsiyum- ve sodyum laktat olmak üzere üç formu bulunan laktat gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunlardan sodyum laktat, gıdanın pH'sını değiştirmedeği, tadını geliştirdiği, antioksidatif ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve gıdaların raf ömrünü uzattığı için tercih edilmektedir (Wit ve Romboust, 1990; Houtsma vd., 1993). Houtsma vd. (1996), genel olarak sıcaklığın sodyum laktatın antimikrobiyal etkisi üzerinde bir etkisi bulunmadığını gözlemişlerdir. Buna karşın, Wit ve Romboust (1990), optimumun altındaki sıcaklık seviyelerinde antimikrobiyal aktivitenin artabileceğini belirtmişlerdir. Sodyum laktatın antimikrobiyal aktivitesinin düşük pH değerlerinde arttığı ve asidik pH seviyelerinde maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir (Grau, 1980; Houtsma vd., 1996). Houtsma vd. (1996), pek çok bakterinin inhibisyonu için, pH 7.0'de 893 mM'ın üstünde laktat konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulurken, pH 5.7'de 268 mM'dan düşük sodyum laktat seviyelerinin inhibisyon için yeterli olduğunu ortaya koymuşlardır. pH 6.3 seviyesinde 625-714 mM arasında sodyum laktat konsantrasyonlarının *B. cereus*'un inhibisyonu için yeterli olduğu görülmüştür (Houtsma vd., 1993).

Sonuç olarak, sodyum laktatın *B. cereus* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği bilinmektedir. Ancak, bu gıda katkı maddesinin *B. cereus*'un çoğalma kinetiği üzerindeki etkisi ve antimikrobiyal aktivitesinin pH ve sıcaklık etkileşimi sayısal olarak ifade edilmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada sıcaklık, pH ve sodyum klorürün sodyum laktatın *B. cereus*'un büyüme kinetiği üzerindeki etkisinin modellenmesi ve pH, sıcaklık ve sodyum klorürün sodyum laktatın antimikrobiyal aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve metod

Suşlar

Çalışmada üç farklı *B. cereus* suşu kullanılmıştır: DSMZ 4313 ve DSMZ 4312 (DZMZ, Almanya) ve NRRL B-3711 (Ulusal Tarımsal Araştırma Merkezi, Illinois, ABD).

Besi yeri

Deneysel çalışmalarda sıvı besi yeri olarak BHI (Difco, Detroit, MI) ve katı besi yeri olarak TSA (Oxoid CM132) kullanılmıştır.

Hazırlanan BHI'ye uygun miktarlarda sodyum klorür (Merck) ve sodyum laktat (% 50, Merck) katılarak 85 (% 0.5), 342 (% 2.0) ve 600 mM (% 3.5) sodyum klorür ve 0, 200 (% 1.7), 400 (% 3.5) ve 600 mM (% 5.0) sodyum laktat konsantrasyonları elde edilmiştir. Besi yerinin pH'sı 4 N KOH (Merck) ve 4 N HCl (Merck) kullanılarak deney deseninde belirtilen seviyelere ayarlanmıştır. Besi yeri 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve pH'sı kontrol edilmiştir.

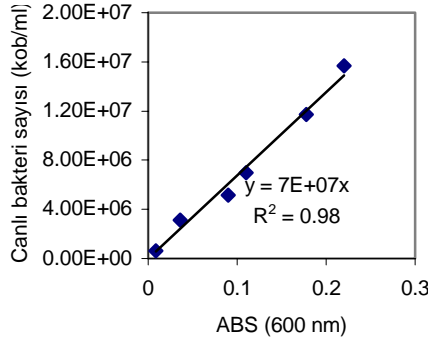
Inokülümün hazırlanması ve bakteri gelişiminin ölçülmesi

Herbir suş, BHI besi yerinde 30°C sıcaklıkta 18 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra son inokülasyon seviyesi 10⁶ kob/ml olacak şekilde her bir suştan eşit konsantrasyonlarda alınarak pH, sodyum laktat ve sodyum klorür seviyeleri ayarlanıp sterilize edilmiş BHI örneklerine ekim yapılmıştır.

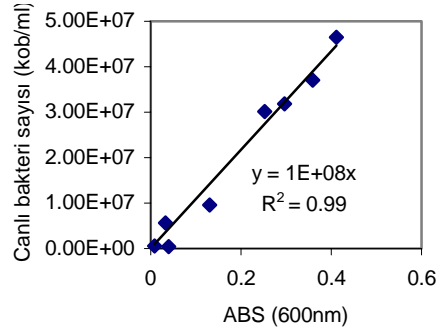
Bakteriyel gelişim, Baker ve Griffiths (1993)'in açıkladığı şekilde, spektrofotometre ile 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek

(Milton Roy Spectronic 1201) takip edilmiştir. Her bir gelişim eğrisinin oluşturulması için 7-20 ölçüm yapılmıştır. 30 gün boyunca gelişim gözlenmeyen koşullarda bakterinin inhibe olduğu kabul edilmiştir.

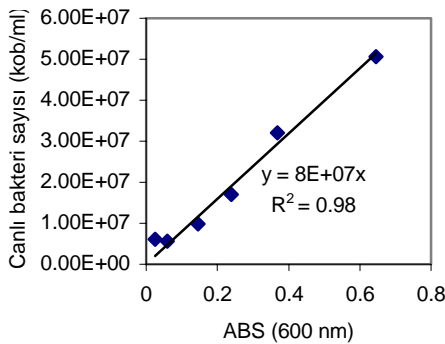
Absorbans (ABS) değerlerini canlı bakteri sayısına (kob/ml) çevirmek için, Hudson (1994) tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır (Şekil 1-3).



Şekil 1. *B. cereus* DSMZ 4313 suşunun kalibrasyon eğrisi



Şekil 2. *B. cereus* DSMZ 4312 suşunun kalibrasyon eğrisi



Şekil 3. *B. cereus* NRLL B-3711 suşunun kalibrasyon eğrisi

Deney deseni

Veriler kısmi faktöriyel deney deseni ve tam faktöriyel deney desenine göre toplanmıştır. Kısmi faktöriyel deney desenine göre yapılan çalışmada herbir faktör iki seviyede çalışılmıştır:

T (Sıcaklık): 8, 32°C

pH: 5.3, 6.3

NAL (Sodyum laktat): 0, 400 mM

NACL (Sodyum klorür): 85, 600 mM

Tam faktöriyel deney desenine göre yapılan çalışmada faktör seviyeleri aşağıdaki gibidir:

T: 8, 15, 26, 32°C

pH: 5,3, 5,8, 6,3, 6,8, 7,3

NAL: 0, 200, 400, 600 mM

NACL: 85, 342, 600 mM

Çoğalma kinetik parametrelerinin hesaplanması ve istatistiksel analiz

Bakteri sayısının zamana bağlı değişimini gösteren büyüme eğrileri STATISTICA programında, lineer olmayan regresyon prosedürüne göre Gompertz fonksiyonu kullanılarak oluşturulmuştur. Gompertz fonksiyonu aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir (McMeekin vd., 1993):

$$L(t) = A + C \exp(-\exp(-B(t - M)))$$

Bu eşitlikte L(t), t zamandaki log10 bakteri sayısı (kob/ml); t zaman (saat); A, bakterinin başlangıç konsantrasyonu (kob/ml), C asimptotik çoğalma miktarı; B, M zamandaki bağıl çoğalma hızı; M (saat) mutlak çoğalma hızının maksimum olduğu zamandır.

Buna göre çoğalma hızı (GR) ve lag fazı süresi (LAG) aşağıdaki formüllerle hesaplanır (McMeekin vd., 1993):

$$GR = (B \cdot C) / e \quad (e=2.718)$$

$$LAG = M - (1/B)$$

Polinomal modeller ve üç boyutlu grafikler, STATISTICA programında çoklu lineer regresyon prosedürü kullanılarak oluşturulmuştur.

Sonuçlar ve tartışma

Çalışma sonucunda lag fazı süresi (LAG) ve büyüme hızı (GR) için elde edilen ikinci dereceden polinom modeller Tablo 1’de verilmiştir. STATISTICA programında “Bacward Stepwise Regression” prosedürü kullanılarak oluşturulan bu modellerde, sadece bağımsız değişkenler üzerinde $p < 0.05$ düzeyinde önemli bir etkiye sahip olan parametreler alınmış, diğerleri modelin dışında bırakılmıştır. Şekil 4-7’de, Tablo 1’de verilen modeller kullanılarak çizdirilen ve bağımsız değişkenlerin (sıcaklık, pH, sodyum laktat ve sodyum klorür konsantrasyonları) bağımlı değişkenler (lag fazı süresi, büyüme hızı) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu grafikler verilmiştir. Bu grafikler, özellikle bağımsız değişkenler arasındaki ilişkilerin anlaşılması açısından kolaylık sağlamaktadır.

B. cereus’un büyüme hızı ve lag fazı süresi üzerinde, sodyum laktat konsantrasyonunun istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.05$) etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 1.) Ayrıca, sodyum laktatın *B. cereus* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin, ortam sıcaklığı ve pH’dan önemli düzeyde etkilendiği, yani sodyum laktat-sıcaklık ve sodyum laktat-pH etkileşimlerinin $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. Bu etkileşimler tepki-yüzey grafiklerinde görülmektedir (Şekil 4-7). Şekil 4’te *B. cereus*’un lag fazı süresi (LNLAG) üzerine sodyum laktat konsantrasyonu (NAL) ve sıcaklığın (T) etkisi görülmektedir. Houtsma vd. (1996) yaptıkları

çalışmada, sodyum laktatın anktivitesi üzerinde sıcaklığın spesifik bir etkisinin bulunmadığını görmüşlerdir. Buna karşılık de Wit ve Romboust (1990), optimumun altındaki sıcaklıklarda, sodyum laktatın daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini kaydetmişlerdir. Tüm bunların aksine, bu çalışmada, laktatın antimikrobiyal aktivitesinin yüksek sıcaklıklarda arttığı görülmüştür. Bu etki Şekil 4 ve 5’te de görülmektedir. Hem LAG (Şekil 4) hem de GR (Şekil 5) için, yüksek sıcaklık değerlerinde laktata bağlı olarak *B. cereus*’un kinetik parametrelerindeki değişim düşük sıcaklık seviyelerine göre daha fazla olmuştur. Sıcaklık ve sodyum laktat arasındaki bu beklenmeyen ilişki *B. cereus*’a özgü bir durum olabilir. Çünkü, laktatın bir bakteri üzerindeki spesifik etkisinin, o bakterinin bu maddeye karşı hücresel düzeyde ne tür bir tepki verdiğine bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (de Wit ve Romboust, 1990; Houtsma vd., 1996). Bu nedenle bu tarz bir etkileşimin nedeni, *B. cereus*’un hücre duvarında sıcaklığa bağlı olarak meydana gelen değişimler ve bu değişimlerden laktat gibi maddelerin hücre içine girişinin ne şekilde etkilendiği ile açıklanabilir.

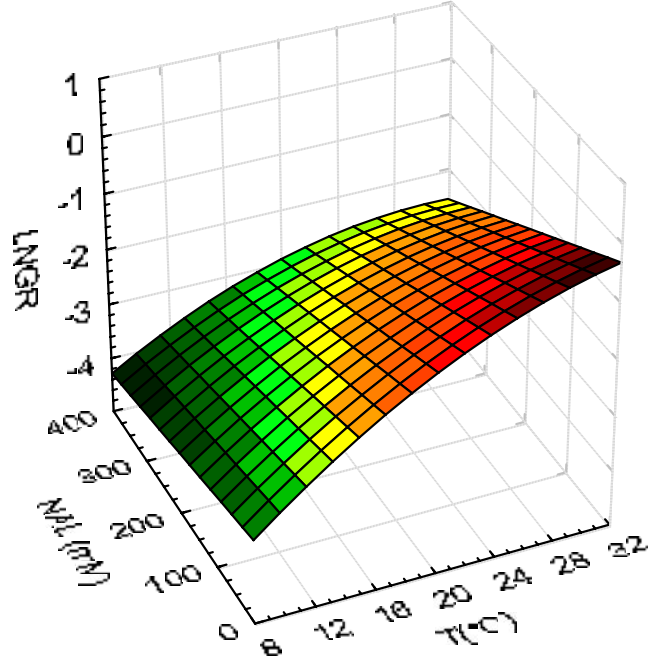
Daha önce pekçok çalışma sonucunda (Blom vd., 1997; Houtsma vd., 1996; Murphy vd., 1997) kaydedildiği gibi, bu çalışmada da sodyum laktatın *B. cereus* üzerindeki bakteriostatik ve bakteriosidik aktivitesinin düşük pH seviyelerinde yükseldiği görülmüştür (Şekil 6 ve 7).

Tablo 1. LAG ve GR modelleri

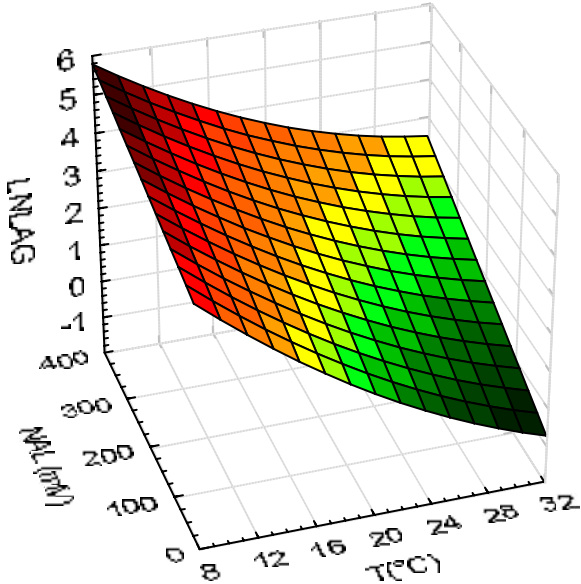
Model	RMSE	R ²
$\ln \text{LAG} = 21.462 - 0.388 * T - 4.222 * \text{PH} + 0.0143 * \text{NAL} + 0.003 * \text{NACL} +$ $0.004 * T^2 + 0.303 * \text{PH}^2 - 0.0000065 * \text{NACL}^2 +$ $0.000189 * T * \text{NAL} + 0.000175 * T * \text{NACL} - 0.00195 * \text{PH} * \text{NAL}$	0.32	95.2
$\ln \text{GR} = -20.251 + 0.411 * T + 3.743 * \text{PH} - 0.0096 * \text{NAL} - 0.0034 * T^2 -$ $0.2220 * \text{PH}^2 + 0.00000603 * \text{NACL}^2 - 0.0203 * T * \text{PH} -$ $0.00015 * T * \text{NAL} - 0.000058 * T * \text{NACL} + 0.0013 * \text{PH} * \text{NAL} -$ $0.0007 * \text{PH} * \text{NACL}$	0.27	93.9

Şekil 6'da görüldüğü gibi, *B. cereus*'un lag fazı süresinde artan sodyum laktat konsantrasyonuna bağlı olarak meydana gelen artış düşük pH seviyelerinde, yüksek pH seviyelerine kıyasla daha keskin olmuştur. Benzer şekilde, büyüme hızında artan laktat konsantrasyonuna bağlı olarak meydana azalma, düşük pH seviyelerinde yüksek pH seviyelerine oranla daha fazladır. Aynı etkileşim Grau (1980) ve Young ve Foeding (1993) tarafından da kaydedilmiştir. Laktatın bakteriosidik aktivitesinin düşük pH seviyelerinde artmasının, bakteri hücre içi pH'sındaki düşüşten kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Cherrington vd., 1991; Shelef, 1994). Kaskhet (1987), hücre içi pH'sındaki bir düşüşün, hücresel fonksiyonları baskılayabileceğini ve pH'nın belli bir seviyenin altına inmesi durumunda hücresel fonksiyonların tamamen durabileceğini belirtmiştir.

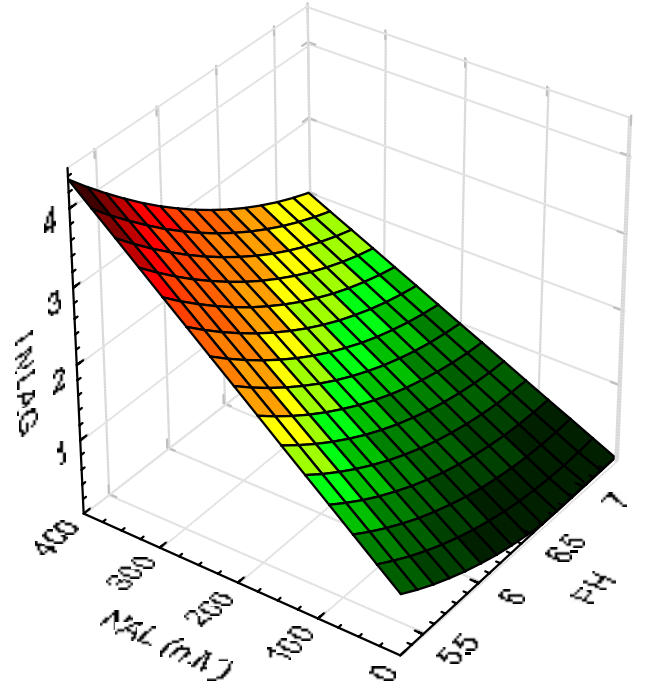
Çalışmanın sonuçları, sodyum laktatın *B. cereus*'un büyüme kinetiği üzerinde hem bakteriostatik hem de bakteriosidik etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin sıcaklık ve pH'ya bağlı olarak önemli oranda değiştiğini göstermiştir. Ancak, sodyum laktatın *B. cereus* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin ortamın sodyum klorür konsantrasyonundan etkilenmediği görülmüştür.



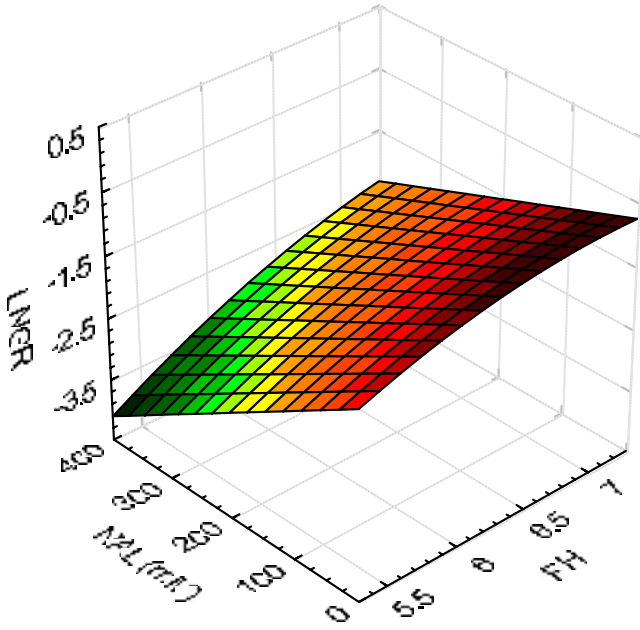
Şekil 5. *B. cereus*'un büyüme hızı (LN GR) üzerine sodyum laktat konsantrasyonu (NAL) ve sıcaklığın (T) etkisini gösteren tepki-yüzey grafiği (pH = 6,8, NaCl = 85.6 mM)



Şekil 4. *B. cereus*'un lag fazı süresi (LN LAG) üzerine sodyum laktat konsantrasyonu (NAL) ve sıcaklığın (T) etkisini gösteren tepki-yüzey grafiği (pH = 6,3, NaCl = 85.6 mM)



Şekil 6. *B. cereus*'un lag fazı süresi (LN LAG) üzerine sodyum laktat konsantrasyonu (NAL) ve pH'nın (PH) etkisini gösteren tepki-yüzey grafiği (T = 26 °C, NaCl = 85.6 mM)



Şekil 7. *B. cereus*'un büyüme hızı (LAGR) üzerine sodyum laktat konsantrasyonu (NAL) ve pH'nın (PH) etkisini gösteren tepki-yüzey grafiği ($T = 26\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{NaCl} = 85.6\text{ mM}$)

Semboller

- GR :Büyüme hızı (log artış/s)
LAG :Lag fazı süresi (s)
T :Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
NAL :Sodyum laktat konsantrasyonu (mM)
PH :pH
L(t) :t zamandaki log10 bakteri sayısı
t :Zaman (s)
A :Bakterinin başlangıç konsantrasyonu (kob/ml)
C :Asimptotik çoğalma miktarı
B :M zamandaki çoğalma hızı
M :Mutlak çoğalma hızının maksimum olduğu zaman (s)

Kaynaklar

- Baker, J. M. ve Griffiths, M. W., (1993). Predictive modeling of psychrotrophic *B. cereus*, *Journal of Food Protection*, **56**, 8, 684-688.
Blom, H., Nerbrink, E., Dainty, R., Hagtvedt, T., Borch, E., Nissen, H., ve Nesbakken, T., (1997). Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory acceptable serelat sausage and cooked ham stored at 4°C , *International Journal of Food Microbiology*, **38**, 71-76.

- Cherrington, C.A., Hinton, M., Mead, G.C. ve Chopra, I., (1991). Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications, *in Advances in Microbial Physiology*, 87-108, Eds. Rose, A.H. and Tempest, D.W., Academic Press, London.
Choma, C., Clavel, T., Dominguez, H., Razandramboa, N., Soumille, H., Nguyen, C., ve Schmitt, P., (2000). Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415, *International Journal of Food Microbiology*, **55**, 73-77.
Chorin, E., Thuault, D., Cleret, J. J. ve Bourgeois, C. M., (1997). Modelling *B. cereus* growth, *International Journal Food Microbiology*, **38**, 229-234.
de Wit, J.C. ve Romboust, F.M., (1990). Antimicrobial activity of sodium lactate, *Food Microbiology*, **7**, 113-120.
Dufrenne, J., Bijwaard, M., te Giffel, M., Beumer, R. ve Notermans, S., (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates, *International Journal of Food Microbiology*, **27**, 175-183.
Granum, P. E., (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**, (Symposium Supplement), 61S-66S.
Grau, F.H., (1980). Inhibition of the anaerobic growth of *Brochotrix thermosphacta* by lactic acid, *Applied and Environmental Microbiology*, **40**, 433-436.
Houtsma, P.C., Kant-Muermans, M.L., Romboust, F.M. ve Zwietering, M.H., (1996). Model for the combined effects of temperature, pH, and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and bologna-type sausages, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1616-1622.
Houtsma, P. C., Wit, J. C. ve Rombouts, F. M., (1993). Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products, *International Journal of Food Microbiology*, **20**, 247-257.
Hudson, J.A., (1994). Comparison of response surface models for *Listeria monocytogenes* strains under aerobic conditions, *Food Research International*, **27**, 53-59.
Kashket, E.R., (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance, *FEMS Microbiology Reviews*, **46**, 233-244.
McMeekin, T. A., Olley, J.N., Ross, T. ve Ratkowsky, D. A., (1993). *Introduction in Predictive Microbiology: Theory and*

Sodyum laktatın Bacillus cereus'un büyüme kinetiği üzerindeki etkisi

- Application*, 1-9, Research Studies Press Ltd./John Wiley and Sons Inc. New York.
- Murphy, P.M., Rea, M.C. ve Marchand, E., (1997). Predicting bacterial growth in processed milk and dairy products, *IIF-IIR-Commission C2*, Quimper, France, 1997/2, 213-223.
- Quintavalla, S. ve Parolari, G., (1993). Effects of temperature, water activity and pH on the growth of *Bacillus* cells and spores: a response surface methodology study, *International Journal of Food Microbiology*, **19**, 207-216.
- Shelef, L. A., (1994). Antimicrobial effects of lactates: A review, *Journal of Food Protection*, **57**, **5**, 445-450.
- Young, K.M. ve Foegeding, P.M., (1993). Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH, *Journal of Applied Bacteriology*, **74**, 515-520.