

**ÇEŞİTLİ GIDALARDA  
BACILLUS CEREUS  
KONTAMİNASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**YASEMİN ÇEKİÇ  
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
OCAK 2001**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Yasemin ÇEKİÇ'in Çeşitli Gıdalarda *Bacillus cereus* Kontaminasyonunun Araştırılması başlıklı Biyoloji Anabilimi Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 24.01.2001 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Kıymet Güven	
Üye	: Prof. Dr. Merih Kıvanç	
Üye	: Doç. Dr. Gül Durmaz	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 31.01.2001 tarih ve 4/2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Çeşitli gıdalarda *Bacillus cereus*  
Kontaminasyonunun Araştırılması

YASEMİN ÇEKİÇ

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Kıymet GÜVEN

2001

*Bacillus cereus* gıda zehirlenmelerine neden olur. Süt ve süt ürünlerinde kesilme ve ekşimsi krema oluşumu ile bozulmalara yol açar, ayrıca diareye ve kusmaya neden olan iki farklı tipte toksin üretir.

Bu çalışmada, Eskişehir’ de çeşitli yerlerden dondurma, çiğ süt, pastörize süt ve peynir örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerdeki toplam bakteri, toplam bakteri sporu, *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* sporlarının sayımı MYP agar kullanılarak yapılmıştır. *Bacillus cereus* toplam proteinlerinin analizi için SDS-PAGE yöntemi geliştirilmiştir.

Test edilen örneklerin hiçbirinin gıda zehirlenmesine neden olacak seviyede *Bacillus cereus* içermediği gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda zehirlenmesi, *Bacillus cereus*, SDS-PAGE

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****Investigation of *Bacillus cereus*  
Contamination in Some Foods****YASEMİN ÇEKİÇ****Anadolu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology: Major Biology****Supervisor: Doç. Dr. Kıymet Güven  
2001**

***Bacillus cereus* is causal agent of food poisonings. It spoils the dairy products causing sweet curdling and bitty cream. It also produces diarrheal and emetic toxins.**

**In this study raw milk, ice-cream, pasteurized milk and Turkish chese samples were collected from different source in Eskişehir. Enumeration of total bacterial cells, total bacterial spores, *Bacillus cereus* cells and *Bacillus cereus* spores were carried out in these samples by using MYP medium. A method for SDS-PAGE analysis of total proteins of *Bacillus cereus* was developed.**

**None of the samples tested contained significant levels of *Bacillus cereus* to cause food poisonings.**

**Keywords: *Bacillus cereus*, Food Poisonings, SDS-PAGE**

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımda yardımını, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Kıymet Güven' e ve bilgilerinden ve kütüphanesinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Merih Kıvanç' a saygı ve sevgilerimi sunarım.

Çalıőmalarım sırasında bana maddi ve manevi destek veren, yardım eden tüm arkadaşlarıma ve tabiki sevgili aileme teşekkürler ederim.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gıdalardan Kaynaklanan Mikrobiyal Kökenli Hastalıklar.....	2
1.2. <i>Bacillus cereus</i> ; Gıda Zehirlenmesi.....	4
1.3. <i>Bacillus cereus</i> ' un Genel Özellikleri.....	9
1.4. Mikrobiyolojik Standartlar.....	11
1.5. Protein Profil Analizi.....	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
2.1. Materyal.....	15
2.1.1. Örneklerin Alınması	
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler.....	15
2.1.2.1. Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar (PEMBA).....	15
2.1.2.2. Tryptose Blood Agar Base.....	16
2.1.2.3. Mannitol Egg Yolk Polymyxin B Agar.....	16
2.1.2.4. Egg Yolk Emulsiyonu.....	16
2.1.2.5. Plate Count Agar.....	17
2.1.2.6. % 0.85 NaCl.....	17
2.1.2.7. MR-VP Broth.....	17
2.1.2.8. Glukoz Broth.....	17
2.1.2.9. Nitrat Broth.....	18
2.1.2.10. Nütrient Agar.....	18

2.1.2.11. Nütrient Broth.....	18
2.1.2.12. Pepton Salin Solüsyonu.....	19
2.1.2.13. Kristal Viyole Solüsyonu.....	19
2.1.2.14. İyot Solüsyonu.....	19
2.1.2.15. Safranin Solüsyonu.....	19
2.1.2.16. $\alpha$ -Naftol Solüsyonu.....	20
2.1.2.17. $\alpha$ -Naftilamin Solüsyonu.....	20
2.1.2.18. Sülfanilik Asit Çözeltisi.....	20
2.1.2.19. % 40' lık KOH Çözeltisi.....	20
2.1.2.20. BSA Stok Solüsyonu.....	21
2.1.2.21. Tampon A.....	21
2.1.2.22. Tampon B.....	21
2.1.2.23. Lizozim Solüsyonu.....	21
2.1.2.24. Tris Citrate.....	22
2.1.2.25. % 30 Acrylamide Karışımı.....	22
2.1.2.26. 1.5 M Tris.....	22
2.1.2.27. 1 M Tris.....	22
2.1.2.28. % 10 SDS.....	23
2.1.2.29. % 10 AMPS Solüsyonu.....	23
2.1.2.30. % 10' luk Ayırma Jeli.....	23
2.1.2.31. % 5' lik Yükleme Jeli.....	23
2.1.2.32. 2X Jel Yükleme Tamponu.....	24
2.1.2.33. 5X Yürütme Tamponu.....	24
2.1.2.34. Coomassie Brilliant Blue (Jel Boyası).....	25
2.1.2.35. Jel Yıkama Tamponu.....	25
2.1.2.36. Jel Koruma Solüsyonu.....	25
2.2. Yöntem.....	26
2.2.1. <i>Bacillus cereus</i> İzolasyonu İçin Uygun Besi Ortamının Belirlenmesi.....	26
2.2.2. Dondurma Örneklerinin İncelenmesi.....	26
2.2.3. Çiğ Süt Örneklerinin İncelenmesi.....	26
2.2.4. Pastörize Süt Örneklerinin İncelenmesi.....	27

2.2.5. Peynir Örneklerinin İncelenmesi.....	27
2.2.6. Elde Edilen İzolatlara Uygulanan İdentifikasyon Testleri	28
2.2.6.1. Gram Boyama.....	28
2.2.6.2. Glukozdan Asit ve Gaz Oluşturma.....	28
2.2.6.3. Nitrat Redüksiyonu.....	29
2.2.6.4. Voges Proskauer Reaksiyonu.....	29
2.2.6.5. Hemoliz Testi.....	29
2.2.6.6. Katalaz Testi.....	29
2.2.6.7. Nütrient Agarda Üreme.....	30
2.2.7. Total Hücre Proteinlerinin Elde Edilmesi.....	30
2.2.8. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi.....	31
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>33</b>
3.1. <i>Bacillus cereus</i> İzolasyonu İçin Uygun Besi Ortamının Belirlenmesi	33
3.2. İncelenen Örneklerdeki Mikroorganizma Sayıları.....	34
3.2.1. Dondurma Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları.....	34
3.2.2. Çiğ Süt Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları.....	36
3.2.3. Pastörize Süt Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları...	36
3.2.4. Peynir Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları.....	37
3.3. Elde Edilen İzolatlara Uygulanan İdentifikasyon Testleri.....	41
3.3.1. Gram Boyama ve Hücre Morfolojisi.....	41
3.3.2. Glukozdan Asit ve Gaz Oluşturma.....	41
3.3.3. Katalaz Testi.....	41
3.3.4. Hemoliz Testi.....	42
3.3.5. Nitrat Redüksiyonu.....	42
3.3.6. Voges Proskauer Reaksiyonu.....	42
3.3.7. Nütrient Agarda Üreme.....	42
3.4. Total Hücre Proteinlerinin Elde Edilmesi ve SDS-PAGE.....	50
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>53</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>61</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1. Standart <i>Bacillus cereus</i> ' un (NRRL B 3711) MYP agarda görünümü	43
3.2. Glukozdan asit ve gaz oluşumu, Voges Proskauer reaksiyonu ve nitrat redüksiyonu test sonuçları	44
3.3. Total hücre proteinlerinin elde edilmesinde kullanılan 3 yonteme ait protein bantları	51
3.4. <i>Bacillus cereus</i> izolatlarının total hücre proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile incelenmesi	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Gıdalarla bulaşan bakteriyel kökenli hastalıklar, etmenleri ve özellikleri	3
3.1. MYP, PEMBA ve tryptose blood agar besiyerlerinin dondurma örneklerinden <i>Bacillus cereus</i> izolasyonu yönünden karşılaştırılması	33
3.2. Dondurma örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre ve <i>Bacillus cereus</i> sporlarının sayısı	35
3.3. Çiğ süt örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre ve <i>Bacillus cereus</i> sporlarının sayısı	38
3.4. Pastörize süt örneklerindeki toplam bakteri ve toplam <i>Bacillus cereus</i> sayıları	39
3.5. Peynir örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre ve <i>Bacillus cereus</i> sporu sayıları	40
3.6. İdentifikasyon test sonuçları	45
3.7. Total hücre proteini elde etmek için kullanılan 3 yöntemle ait absorbans sonuçları	50

## 1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların gıdalardaki varlığının ve rolünün ilk kez insanoğlu tarafından ne zaman farkedildiğini kesin olarak saptamak mümkün olmamakla beraber bu konudaki bilgi birikiminin mikrobiyoloji biliminin bir bilim dalı olarak gelişmesine önemli bir katkıda bulunduğu bir gerçektir. Gıdaların gerek doğal floralarında bulunan ve gerekse sonradan bulaşan mikroorganizmaların üretmiş olduğu çeşitli enzimlerin faaliyetleri sonucu bozulması, insanoğlunun gıdaların bir bölümünü ileride tüketmek üzere nasıl saklayabileceğini araştırması zorunluluğunu doğurmuştur [1].

1658 yılında A. Kircher adında bir din adamı tarihte belki de ilk kez mikroorganizmaların gıdaların bozulmasındaki rolünden söz etmiştir. 1683 yılında A. Leeuwenhoek mikroskobu keşfederek mikroskobik canlıların varlığını göstermiştir. 1765 tarihinde L. Spallanzani 1 saat süre ile kaynatılan ve dış ortama kapalı olarak bekletilen et suyunun bozulmadığını kanıtlamıştır. 1837 yılında Schwan kaynatılan ot infüzyonunun içerisinde steril hava geçirerek ortama oksijen vermiş ve bu koşullar altında ot infüzyonunun bozulmadığını göstermiştir. 1800' lü yıllarda F. Appert kaynar suda bekletilen kavanoz içerisindeki etlerin bozulmadan saklanabileceğini göstermiştir. Bu buluş günümüzde de uygulanmakta olan konservecilik temelinin oluşturmuştur. L. Pasteur 1837' de sütün ekşimesine ve bozulmasına mikroorganizmaların neden olduğunu ve 1860 yılında bira ve şarapta bozulmaya neden olan mikroorganizmaların ısısal işleme yokedilebileceğini göstererek günümüzde de gıda sanayisinde yaygın olarak kullanılan pastörizasyon uygulamalarının temelinin atmıştır. L. Pasteur' den günümüze değin gıdaların bozulması ve muhafazası, fermentasyon mikrobiyolojisi, gıdalarla insanlara geçen enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojik gıda zehirlenmeleri konularında önemli gelişmeler olmuş ve gıda mikrobiyolojisi günümüzde ayrı bir bilim dalı olarak ortaya çıkarak bu konuda daha ayrıntılı çalışmalar yapılmaya başlamıştır [1,2].

Gıdalarımızın birçoğu patojenler de dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizma gruplarının üremeleri ve gelişmeleri için uygun ortamlardır. Patojen mikroorganizmalar ile bulaşmış gıdaların tüketimi sonucu gıda

enfeksiyonu ve zehirlenmesi gibi insan sağlığını bozan hatta tehdit eden hastalıkların ortaya çıkması kaçınılmazdır. Bu durumda mikrobiyolojik kalite kontrolünün amacı iki alt başlıkta toplanabilir.

1. Gıda kaynaklı hastalıkların (gıda enfeksiyonları ve gıda zehirlenmeleri) önlenmesi suretiyle halk sağlığının korunması,
2. Gıdalarda mikrobiyal üremenin ve bunun sonucu oluşan bozulmanın önlenmesi veya geciktirilmesi suretiyle gıda kalitesinin iyileştirilmesi olarak belirlenmiştir [3].

### 1.1. Gıdalardan Kaynaklanan Mikrobiyal Kökenli Hastalıklar

Klasik olarak, gıdaların yenilmesinden belirli bir süre sonra bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal, baş dönmesi, ateş gibi belirtilerle ortaya çıkan sağlık bozuklukları veya hastalıklara gıda zehirlenmeleri (gıda enfeksiyonları ve gıda intoksikasyonları) adı verilmektedir [4]. Gıdalardan kaynaklanan hastalıkların en yaygın olanları bakteriyel kökenliler olup, daha hızlı seyreder ve nispeten çabuk ortaya çıkarlar [5]. Gıda kökenli bakteriyel hastalıkların etkenlerine ve bazı özelliklerine ilişkin bilgiler farklı kaynaklardan yararlanılarak izelge 1.1' de verilmiştir [1,3,4,5].

Kontamine gıdaların yenilmesinden itibaren sık veya seyrek gerçekleşen bireysel olaylar ve kitlesel patlamalar yani salgınlar ortaya çıkabilir. Hastalık oluşturabilme bakterinin hastalığa sebep olabilecek konsantrasyon veya sayıya ulaşması, mikroorganizmanın virölansı, kişilerin yaşı ve genel sağlık durumu ile de ilgili olmaktadır [5].

Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarında, etkenlerin önemini belirlemede istatistiklere bakılırsa; *Staphylococcus aureus* intoksikasyonları ile *Salmonella* enfeksiyonlarının öncelikli oldukları gözlenmiştir. Bunları *Clostridium perfringens* intoksikasyonu takip etmiştir [4,5,6].

Çizelge 1.1. Gıdalarla bulaşan bakteriyel kökenli hastalıklar, etmenleri ve özellikleri [1,3,4,5]

Hastalık	Etken Bakteri	Tehlike Derecesi	Riskli Olabilecek Gıdalar
Salmonellosis (Tifo)	<i>Salmonella typhimurium</i>	Yüksek	Et-tavuk ürünleri, yumurta, uzun süre ılık koşullarda bekletilen yemekler, süt, su ürünleri.
<i>Staphylococcus</i> zehirlenmeleri	<i>Staphylococcus aureus</i>	Düşük-Orta	Et, kremalı ürünler, tavuk, dondurma, peynirler, salatalar, mayonez, pasta çeşitleri.
<i>Clostridium</i> zehirlenmeleri	<i>Clostridium perfringens</i>	Yüksek	İyi muhafaza edilememiş et, tavuk ve deniz ürünleri, konserveler.
Botulizm	<i>Clostridium botulinum</i>	Yüksek	Konserveler, et ve deniz ürünleri.
Basil zehirlenmesi	<i>Bacillus cereus</i>	Orta-Düşük	Pirinçli, nişastalı yiyecekler, süt ve süt ürünleri, sebze ürünleri.
Koliform zehirlenmeleri	<i>Eshcherichia coli</i> (EEC)	Orta	Et, tavuk ürünleri, süt ve süt ürünleri, özellikle peynir.
<i>Vibrio</i> zehirlenmeleri	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	Orta	Su ürünleri (kabuklular, balık, midye, istiridye)
Kolera	<i>Vibrio cholerea</i>	Yüksek	Su, fekal artık bulaşmış hammadde, iyi pişmemiş-çiğ gıdalar, salatalar, kontamine suyla yıkanmış sebze-meyve (hasta-portörle temas)
Campylosis	<i>Campylobacter</i> spp <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>	Orta-Düşük	Çiğ süt ve ürünleri, tavuk-hindi eti, domuz eti, nadiren sığır eti. (Gübre ve hayvan yemi bulaşmaları)
Yersiniosis	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Düşük	Çiğ yumurta, domuz eti, çiğ sebze, çiğ et, çiğ süt ve peynir, kanatlı etleri.
<i>Streptococcus</i> zehirlenmeleri	<i>S. faecalis</i> <i>S. faecium</i> <i>S. zooepidemicus</i>	Orta	Çiğ süt, peynir, et yemekleri, sosis, kanatlı etleri. (dışkı bulaşığı)
Basilli dizanteri Shigellosis	<i>Shigella</i> spp. <i>S. sonnei</i> <i>S. flexnuri</i>	Orta	İçme suyu, süt, çeşitli salatalar, karides, kötü sanitasyon koşullarında işlenmiş gıdalar. (Fekal-oral yolla bulaşma)
Tifoid-paratifoid ateşli hastalıklar	<i>Salmonella</i> spp <i>S. mbandaka</i> <i>S. senftenberg</i> <i>S. agana</i>	Orta	Çiğ süt, kontamine su, yetersiz hijyen koşullarında işlenmiş gıdalar, çiğ gıdalar. (Hasta-portörle temas)
Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	Yüksek	Süt ve ürünleri, çiğ süt, yetersiz ısı işlem uygulanmış hayvansal ürünler, sebzeler, salatalar, deniz ürünleri, kanatlı ürünleri.
Brusellosis Malta Humması	<i>Brucella abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. suis</i>	Orta-Yüksek	Çiğ süt, çiğ süttten yapılan peynirler, hasta hayvanlarla gıda hammaddesine ve insana taşınabilir.
Q-Humması Rickettsial hastalık	<i>Coxiella burnetii</i>	Orta	Çiğ süt ve ürünleri, çiğ et ve ürünleri, hayvansal kökenli hammadde ve yetersiz ısı işlem görmüş hayvansal ürünler.

Yurdumuzda gıda zehirlenmelerinin en çok rastlanılanlarını toplu olarak beliren ve büyük ihtimalle *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Bacillus cereus* en önemli etkenler olmak üzere, 1-2 gün süren, sonra iyileşmeyle sonuçlanan olaylar teşkil etmektedir. *Salmonella* yaygınlığı üzerine açıklayıcı bilgi verme imkanı bulunamamıştır. Ancak, dünyada Salmonellosis olaylarının insanlarda ciddi bir şekilde artış gösterdiği bilinmektedir. Yurdumuzda ishaller ve ateşli hastalıkların ne kadarının *Salmonella*' dan kaynaklandığı konusunda herhangi bir bilgi bulunmamaktadır [4].

## 1.2. *Bacillus cereus*; Gıda Zehirlenmesi

*Bacillus cereus* gıda zehirlenmelerine neden olan patojen bir mikroorganizmadır. Bir yandan fermentatif etkisiyle gıda maddelerinde kokuşmaya varan bozulmalara neden olurken diğer taraftan ısıya dirençli sporlarıyla gıda hijyeni yönünden ayrı bir önem taşımaktadır. *Bacillus cereus* ayrıca oluşturduğu toksin nedeniyle de gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. *Bacillus cereus*' un toksin oluşturmasının ortamda bazı besin öğelerinin varlığına bağlı olduğu belirtilmiştir. Organizma, toksinini logaritmik faz sırasında sentezleyip salgılamaktadır ve sporulasyonla birlikte toksin üretiminin durmaya başladığı belirtilmiştir [1,7,8].

*Bacillus cereus* iki farklı tip enterotoksin (emetik enterotoksin ve diyarejenik enterotoksin) sentezleyebilmekte ve dolayısıyla iki farklı tip zehirlenme oluşturabilmektedir. Bu toksinlerden diyarejenik toksin enzimlere ve ısıya karşı duyarlı bir toksin olup hücre sayısı yaklaşık  $10^7$  cfu/ml olduğunda etki göstermektedir. Emetik toksin ise ısıya, pH değişikliklerine ve enzimlere dirençlidir. *Bacillus cereus*' un diyare tipi (ishal tipi) gıda zehirlenmesinde inkübasyon süresi 8-16 saat arasında değişmektedir. Belirtileri kramp şeklinde karın ağrısı ve sulu ishaldir. Bu tip *Bacillus cereus* zehirlenmesi *Clostridium perfringens* gıda zehirlenmesine benzerlik göstermektedir. *Bacillus cereus*' un emetik tip (kusma tipi) gıda zehirlenmesinde ise inkübasyon süresi 1-6 saat arasında değişmektedir. Belirtileri karın ağrısı ve özellikle bulantı kusmadır. Bu

tip *Bacillus cereus* zehirlenmesi ise *Staphylococcus aureus* gıda zehirlenmesine benzerlik göstermektedir [1,9,10,11].

1950-1970 yılları arasında *Bacillus cereus*' un etken olduğu gıda zehirlenmelerine yüksek oranda rastlanmasına rağmen son 10 yılda bu tip gıda zehirlenmeleri önemli ölçüde azalmıştır [11].

*Bacillus cereus*'un çeşitli gıdalarda varlığı üzerine ülkemizde yapılmış araştırma sayısı oldukça azdır. Çeşitli dünya ülkelerinde artan önemine ve neden olduğu gıda zehirlenmelerinin yaygınlığına paralel olarak pekçok gıda maddesi *Bacillus cereus*'un varlığı yönünden incelenmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde bazı gıda gruplarının *Bacillus cereus* ile daha fazla kontamine olduğu görülmüştür. Özellikle pirinç ve pirinçli ürünler, tahıllar, baklagiller, baharatlar, kurutulmuş gıdalar, et ve süt ile bunların ürünleri en çok araştırılan gıda maddeleri olmuştur [7,12].

*Bacillus cereus*'un gıda zehirlenmelerinde önemli bir ajan olduğunun farkına ilk olarak 1955 yılında Hauge [13] tarafından varılmıştır ve Norveç'te 600 kişiyi etkileyen 4 ayrı gıda zehirlenmesi olayında etiyolojik etmen olarak bildirilmiştir. 4 vakada da zehirlenmeye neden olan gıda, hazırlanmış ve bir gün bekletilmiş vanilya sosudur. Bu olayı takiben pekçok Avrupa ülkesinde *Bacillus cereus* vakaları tespit edilmiştir. *Bacillus cereus*'un oluşturduğu gıda zehirlenmeleri bir intoksikasyon olup, bakteri sayısı belli bir düzeye ulaştıktan sonra ekstraselüler toksin sentezlenmektedir [14,15]. 1972-1986 yılları arasında salgın şeklinde ortaya çıkan gıda zehirlenmelerinden 52 tanesine *Bacillus cereus*'un neden olduğu ve bu oranında toplamla karşılaştırıldığında % 2 civarında olduğu belirtilmiştir [15].

Konuma ve ark. [7] tarafından Japonya' da yapılan bir çalışmada et ürünlerinden % 18.3 oranında, çiğ etten ise % 6.6 oranında *Bacillus cereus* izole edilmiş ve bu ürünlerin kontaminasyon düzeyleri gramda  $10^{2'}$  den düşük bulunmuştur. Et katkı maddelerinden ise % 39.1 oranında *Bacillus cereus* izole edilmiştir. Kontaminasyon düzeyleri ise gramda  $10^{4'}$  ü aşmıştır. Bu nedenle de et ürünlerindeki *Bacillus cereus* kontaminasyonunun et katkı maddelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Mısır' da, et ürünlerinin analize alındığı bir çalışmada 150 örneğin 34' ü (% 22.6) *Bacillus cereus* içermiştir. El-Sharbaany ve ark. tarafından bildirildiğine göre 172 pirinç ve pirinç ürününün incelendiği çalışmada % 40 oranında *Bacillus cereus* kontaminasyonu gözlenmiş ve  $10^3$  cfu/gr' dan fazla sayıda olduğu bildirilmiştir [7].

Harmon ve ark. [7] tarafından yapılan çalışmada incelenen 98 tahıl ve baklagil örneğinin 56 tanesinde yani % 57' sinde *Bacillus cereus* varlığı gözlenmiştir.

Delazari ve ark. toplam 805 kuru gıda örneğinin analizleri sonucunda soya ununda % 29.2, mısır ununda % 90.3, fasulye unu örneğinde % 25.95, kurutulmuş gıda örneğinde ise % 41 oranında *Bacillus cereus* bulunduğunu bildirmişlerdir [7].

Hazır çorba konsantreleri üzerine yapılmış bir araştırmada 86 hazır çorba örneğinin 16 tanesi (% 18.6) *Bacillus cereus* ile kontamine bulunmuştur. Kim ve ark. tarafından 170 kurutulmuş gıda ürününün % 25.3' ünde, *Bacillus cereus*' un mevcut olduğu gösterilmiştir. Tatlandırıcı maddelerin % 55' i, baharatların % 40' ı, kurutulmuş patateslerin % 40' ı, süt tozunun % 37.5' i, spagetti soslarının % 37.5' i *Bacillus cereus* ile kontamine bulunmuştur [7].

Orijinal ambalajında çeşitli marketlerden alınan baharat örneklerinin incelendiği diğer bir çalışmada 60 baharat örneğinin % 41' i *Bacillus cereus* varlığı yönünden pozitif bulunmuş ve kontaminasyon düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir [7].

Worburton ve ark. Kanada' da imal edilmiş pasta doldurma malzemelerinin % 30' unun gramında 25-250 *Bacillus cereus* bulunduğunu belirtmişlerdir. Smykal ve ark. tarafından yapılan çalışmada et ve et ürünün örneklerinin % 13.3' ü, çorba ve et kökenli sos örneklerinin % 27.2' si, süt ve süt ürünün örneklerinin % 23' ü, kek örneklerinin % 12.03' ü *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bulunmuştur [7].

Akimov ve ark. inceledikleri konserve gıdalarda % 13.6, sucuklarda % 7.7, pasta-şekerleme ürünlerinde % 6.7 oranında *Bacillus cereus* bulmuşlardır. Aksu yaptığı çalışmada konserve gıdalarda *Bacillus cereus* kontaminasyonuna



rastlamazken, dondurulmuş gıdalarda % 2.7, pastane ürünlerinde % 7, hazır yemeklerde % 10 oranında *Bacillus cereus* gözleendiğini bildirmiştir [7]. Maxey incelediği fermente süt örneklerinde % 16.6 oranında *Bacillus cereus* bulunduğunu çalışmasında bildirmiştir [7].

Schiemann [16] tarafından yapılan çalışmada özellikle pirinçli gıdalarda *Bacillus cereus*'a sık rastlandığı bildirilmiştir. 24 Çin lokantasından alınan 165 çeşit gıda örneği *Bacillus cereus* varlığı yönünden araştırılmış ve 28 gıda örneğinin gramında  $1 \times 10^2$ ' den daha yüksek sayıda *Bacillus cereus* bulunmuştur. Bu 28 gıda örneğinin 20' si pirinçli yiyeceklerdir. 232 *Bacillus cereus* izolatının elde edildiği çalışmada, izolatların % 96' sının katalaz pozitif olduğu, nitrati indirgediği, hemoliz yaptığı, Voges Proskauer reaksiyonlarının pozitif olduğu ve glukozdan asit oluşturduğu tespit edilmiştir.

Blakey ve ark. [17] tarafından yapılan bir çalışmada 39 gıda örneği incelenmiştir. Bu gıda örneklerinin 22 tanesinde (% 56) *Bacillus cereus* kontaminasyonu gözlenmiştir. Gıda örneklerindeki *Bacillus cereus* sayısı,  $1 \times 10^2$ - $6 \times 10^4$  cfu/gr-ml arasında bulunmuştur.

91 süt ve süt ürününün incelendiği bir çalışmada *Bacillus cereus* sayısı gr-ml'de  $5 \times 10^2$ ' yi aşmamıştır. Sadece süttozu örneğinde 960 cfu/gr *Bacillus cereus* saptanmıştır [18].

Wong ve ark. [19] toplam 293 süt ürünü toplayarak bu ürünlerde *Bacillus cereus*'un varlığı ve karakteristik özelliklerini incelemiştir. Yapılan çalışmalarda fermente sütte % 17, dondurmada % 52, yumuşak dondurmada % 35, pastörize sütte % 2 ve süt tozunda % 29 oranında *Bacillus cereus* kontaminasyonuna rastlanmıştır. Süt ürünü örneklerindeki ortalama *Bacillus cereus* sayısı 15-280 cfu/g-ml olarak belirtilmiştir. İncelenen gıda örneklerinin büyük bir yüzdesinde *Bacillus cereus* varlığı gözlenmesine karşın bakteri popülasyonu düşük sayıda bulunmuştur. Ancak *Bacillus cereus*'un gıda patojeni olduğunu ihmal etmemek gerekmektedir. Yapılan çalışmalar süt ürünlerindeki *Bacillus cereus* kontaminasyonunun yaz aylarında diğer aylara göre daha fazla olduğunu göstermiştir.

Ahmed ve ark. [20] yaptıkları bir çalışmada çiğ süt örneklerinin % 9' unda, pastörize süt örneklerinin % 35' inde peynir örneklerinin % 14' ünde, dondurma örneklerinin % 48' inde *Bacillus cereus* kontaminasyonu tespit etmişlerdir. Örneklerdeki *Bacillus cereus* sayısını ise  $1 \times 10^2$ - $3,8 \times 10^3$  cfu/gr-ml olarak belirtmişlerdir.

Süt ürünleri üreten 2 tesisin tanklarından alınan çiğ süt, pastörize süt ve süttozu örnekleri *Bacillus cereus* varlığı yönünden incelenmiş ve toplam 443 *Bacillus cereus* izolatu elde edilmiştir. Çiğ sütlerin % 35' inde *Bacillus cereus* varlığı gösterilmesine rağmen kontaminasyon düzeyi düşük bulunmuştur [21].

Pekçok et ve et ürününde *Bacillus cereus* varlığına yüksek oranda rastlanmasına karşın sayı olarak  $10^2$  cfu/gr'dan daha az sayıda buldukları belirtilmiştir. Bu nedenle de kontaminasyon kaynağının tuz, nişasta ve baharat gibi katkı maddelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [22].

Giffel ve ark. su, toprak çim, hayvan yataklığı, hayvan yemi, içme suyu, süt, hayvan memesi ve dışkısından *Bacillus cereus* izole etmişlerdir. İzolatlar Voges Proskauer reaksiyonu, glukoz fermentasyonu ve nitrat redüksiyonu gibi biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Örneklerdeki *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı  $10^3$ - $10^7$  cfu/gr-ml arasında iken spor sayısı  $10^2$ - $10^5$  cfu/gr-ml arasında belirlenmiştir [23].

Dufrenne ve ark. [24]  $10^0$ C'nin altında gelişebilen psikotrof *Bacillus cereus* strainlerinin varlığını gıda örnekleri ve gıda üretim yerlerinden aldıkları örneklerle belirlemişlerdir. Netten ve ark. [25] 1986-1989 yılları arasında görülen 3 *Bacillus cereus* gıda zehirlenmesinden elde edilen izolatların  $7^0$ C'de gelişebildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca inceledikleri pastörize süt örneklerinin % 8.4' ünü, peynir örneklerinin % 2' sini, *Bacillus cereus* ile kontamine bulmuşlardır. Pastörize süt örneklerinin çok büyük bir kısmında  $10^3$  cfu/ml düzeyinde *Bacillus cereus* bulunmuştur. 7 örnekte ise  $10^5$  cfu/ml' yi aşan düzeylerde *Bacillus cereus*' a rastlanmıştır. Bunun yanında incelenen yumurtalı-sütlü kremanın % 19' u, krem pastanın % 11' i, pirinç yemeklerinin % 6' sı, rosto tavuğun % 5' i, pane balığın % 4' ü, bezelye çorbası ve lazanyanın % 3' ü, sebze .

salatası örneklerinin % 2' si, ve paketlenmiş yemek örneklerinin % 1' i *Bacillus cereus* ile kontamine bulunmuştur [25].

1960-1970 yılları arasında *Bacillus cereus* gıda zehirlenmesine yaygın olarak neden olan bir mikroorganizma olarak bildirilmiştir. 12 çeşit pirinç örneğinin incelendiği Chung ve ark. [26] tarafından yapılan çalışmada 66 *Bacillus cereus* izolatu elde edilmiş ve pirinç örneklerindeki *Bacillus cereus* sayısı  $2 \times 10^2$  cfu/gr'dan daha az olarak bulunmuştur.

Uraz ve ark. [27] çeşitli süt işletmelerinden aldıkları çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden 3 *Bacillus cereus* izolatu elde etmişlerdir. 560 *Bacillus cereus* izolatının elde edildiği Ueda ve ark. [28] tarafından yapılan çalışmada *Bacillus cereus* izolatlarının bazı karakteristik özellikler bakımından farklılık gösterebileceği belirtilmiştir.

Larsen ve ark. [29] tarafından yapılan bir çalışmada incelenen pastörize süt örneklerinin % 56'sı, çiğ süt örneklerinin % 25'i *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bulunmuştur. Pastörize süt örneklerindeki *Bacillus cereus* sayısı  $10^3$ - $3 \times 10^5$  cfu/ml arasında belirlenmiştir.

*Bacillus cereus*'un gıda zehirlenmesine neden olabilmesi için canlı bakteri sayısının  $10^6$  cfu/gr-ml'nin üzerimde olması gerektiği belirtilmiştir [30,31]. Bebek mamalarının da *Bacillus cereus* ile kontamine olabileceği Becker ve ark. [32] tarafından bildirilmiştir.

Kümes hayvanı et ürünlerinin incelendiği bir çalışmayı Sooltan ve ark. [33] gerçekleştirmişler ve bu ürünlerin sadece % 6.9' unu *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bildirmişlerdir. Ancak bu ürünlerdeki *Bacillus cereus* sayısını düşük olarak belirlemişlerdir.

### 1.3. *Bacillus cereus*' un Genel Özellikleri

*Bacillus cereus* ilk olarak 1887 yılında Frankland ve Frankland tarafından izole edilmiş ve tanımlanmıştır [10]. *Bacillus cereus*, *Bacillaceae* familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olup toprak, bitki örtüsü, süt ve tahıllarda varlığına

geniş ölçüde rastlamak mümkündür. Hücre boyutları 1-1,2 µm X 3-5 µm arasındadır. Hücreleri çubuk şeklinde ve endosporludur, sporları elverişsiz şartlara çok dayanıklı olup elipsoidal ve santral veya subterminaldir. *Bacillus cereus* Gram (+) bir bakteridir; gram boyasıyla mor-mavi boyanır. Hareketli, aerobik ya da fakültatif anaerobik bir mikroorganizmadır. Flagellaları peritrik veya dejeneratif peritriktir [1,34]. Optimum üreme sıcaklığı suşlara göre 28-35°C arasında değişmekle birlikte genelde 30°C' dir. Maksimum üreme sıcaklığı ise suşlara göre 37-48°C, minimum üreme sıcaklığı da suşa bağımlı olarak 10-18°C' arasındadır. *Bacillus cereus*'un psikotrof suşları ise 4-5°C sıcaklıkta da gelişebilmektedir. *Bacillus cereus* için optimum üreme pH' sı 6.0-7.0 civarındayken, minimum pH 5.0 maksimum pH 8.8' de üreyebilmektedirler [1,10].

*Bacillus cereus*'un izolasyonu ve geliştirilmesi için çeşitli seçici ortamlar geliştirilmiştir. Bu besiyerleri Gram (-) bakterilerin ortamda üremesini engelleyen polymyxin antibiyotiğini içerirler ve muhtemel identifikasyon egg-yolk (yumurta sarısı) reaksiyonuna bakılarak yapılmaktadır. Egg-yolk reaksiyonu *Bacillus cereus*'un ürettiği lesitinaz enziminin, yumurta sarısındaki lesitini parçalaması ve koloni etrafında opak (ışık geçirmeyen) bir presipitasyon halkasının oluşması esasına dayanmaktadır [35,36]. *Bacillus cereus*'un izolasyonunda yaygın olarak kullanılan besiyerleri Mossel ve ark. tarafından 1967 yılında geliştirilen MYP (Mannitol – Egg yolk – Polymyxin) agar ve Hollbrook ve Anderson [37] tarafından 1980 yılında geliştirilen PEMBA (Polymyxin Pyruvate–Egg yolk–Mannitol–Bromothymol blue)'dır [10]. MYP agar üzerinde *Bacillus cereus* kolonileri krem renkli, etraflarını ve besiyerini pembe-menekşe renkli boyayarak ve etraflarında da bir presipitasyon halkası oluşturarak görünmektedirler. PEMBA üzerinde ise turkuaz mavisi renkli *Bacillus cereus* kolonileri etraflarında presipitasyon halkası oluştururlar. Kanlı agar kullanılarak da *Bacillus cereus* izolasyonu yapılabilirse de çok seçatif bir izolasyon metodu olarak değerlendirilmemektedir. Ancak *Bacillus cereus*' un ürettiği hemolizin ile oluşan tipik kuvvetli hemoliz kanlı agar petrilerinde gözlenebilmekte bu da identifikasyon basamağında kullanılmaktadır [10].

*Bacillus cereus*' un izolasyonu için sıklıkla kullanılan MYP ve PEMBA dışında, PEMBA'nın modifiye edilmiş şekli olan PEMPA Szabo ve ark. [38] tarafından geliştirilmiştir. Bu besiyerini geliştirmenin amacı da inkübasyon süresini kısaltmak olarak belirlenmiştir. MYP agar, PEMBA ve PEMPA' nın *Bacillus cereus* izolasyonu yönünden birbirine benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

*Bacillus cereus*' un izolasyonu için kullanılan MYP ve PEMBA besiyerleri üzerinde *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus thuringiensis*' in de benzer üreme gösterdiği bildirilmiştir. Bu 4 bakteri türünün ayrımı ise başka özellikler yönünden farklılıkları gözönüne alınarak yapılmıştır. Tryptic soy sheep blood agar üzerine inoküle edilen bu 4 tip bakteri 30<sup>0</sup>C 'de 24 saat inkübasyondan sonra incelendiğinde *Bacillus anthracis*' in non-hemolitik, *Bacillus cereus*' un kuvvetli hemolitik, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus thuringiensis*' in zayıf hemolitik olduğu gözlenmiştir. Nutrient agar petrilere yapılan ekimlerde ise rhizoidal üremenin, *Bacillus mycoides*' e özgü olduğu gösterilmiştir [15,39]. Bu 4 bakteriden yalnız *Bacillus thuringiensis*' in endotoksin kristalleri ürettiği ve bu endotoksin kristallerinin faz-kontrast mikroskobu ile incelemeye ya da % 0,5 aqueoz bazik fuksin ve TB karbol fuksin boyamalarıyla gözlenebildiği belirtilmiştir [39,40].

*Bacillus cereus*' un izolasyonunu takiben yapılan identifikasyon testleri ise glukozdan asit oluşturma, hemoliz, katalaz testi, nitratı nitrite indirgeme, Voges-Proskauer reaksiyonu gibi biyokimyasal testler olarak belirlenmiştir [21,23,41]. Bu biyokimyasal testler haricinde üreyi parçalama, hareketlilik testi, nişasta hidrolizi, sitratı kullanma gibi testler de uygulanmıştır [42,43].

#### **1.4. Mikrobiyolojik Standartlar**

Gıdaların mikrobiyolojik kalite kontrolünde kullanılan mikrobiyolojik kriterler kısaca gıdanın mikrobiyolojik karakteristiklerini belirleyen limitler olarak tanımlanabilir. Bu anlamda mikrobiyolojik kriterler daha önceden belirlenmiş örnekleme planına göre standart yöntemlerle analize alınan gıda örneğinde

bulunabilecek mikroorganizma ya da mikroorganizma grupları ile, söz konusu gıdada bu mikroorganizmaların bulunmasına izin verilen düzeyleri belirlemektedir [1].

Gıdalarda bulunabilen mikroorganizmaların;

1. Gıda kökenli hastalık meydana getirebilme gücüne sahip patojenler,
2. Gıdalarda bozulmalara sebep olabilecek mikroorganizmalar,
3. Gıdalarda gelişmeleri sonucu istenmeyen değişiklikler meydana getirebilen türler açısından 3 kategoride kontrol edilmeleri gerekmektedir [4].

Batı ülkelerinin bir çoğunda içme sütü üretiminde kullanılacak çiğ sütlerin mikrobiyal yüklerine ilişkin standartlarda en fazla  $2 \times 10^5$  cfu/ml' ye izin verilmektedir. Ancak bu sınır diğer süt ürünlerinin üretiminde kullanılacak çiğ sütler için  $5 \times 10^5$  hatta  $1 \times 10^6$  cfu/ml' ye kadar çıkabilmektedir. Ülkemizde ise çiğ süt standardında toplam bakteri sayısı ile ilgili limit bulunmamaktadır. Ancak rezasurin testine göre çiğ sütler 3 sınıfa ayrılmaktadır. 10 ml çiğ süt örneğine % 0.05 konsantrasyondaki rezasurin çözeltisinden 0.1 ml ilave edilerek  $37^{\circ}\text{C}$ ' de 1 saat inkübasyon sonrasında oluşan renk değişimi çiğ sütün kalitesini belirlemede esas alınmaktadır. Buna göre 1 saatte renk değişimi gözlenmeyen sütler ekstra, aynı süre içinde eflatun-koyu pembeye dönüşenler 1. sınıf, açık pembe-beyaz olanlar ise 2. sınıf çiğ süt olarak nitelendirilmektedir. Öte yandan yalnızca ekstra ve 1. sınıf çiğ sütlerin içme sütü üretiminde kullanılabileceği hükme bağlanmıştır [1,4].

Türkiye' de pastörize süt standardında ve gıda maddeleri tüzüğünde maksimum  $4 \times 10^4$  cfu/ml olarak saptanan toplam bakteri sayısı, pekçok ülkede maksimum  $1 \times 10^4$ - $2 \times 10^4$  cfu/ml olarak belirlenmiştir [1,4].

Ülkemizde dondurma örneklerinde bulunabilecek maksimum toplam bakteri sayısı ise  $10^5$  cfu/gr-ml olarak belirlenmiştir. Peynir örnekleri için Türkiye' de ve diğer dünya ülkelerinde toplam bakteri sayımı ile ilgili standartlar bulunmamaktadır. Peynir örnekleri toplam koliform bakteri sayıları, küf ve maya sayıları incelenerek kontrol edilmektedir. [1,4].

Ülkemizde *Bacillus cereus*'a ait mikrobiyolojik standartlar bulunmamaktadır. Ancak ülkemiz dışında yapılmış çalışmalarda *Bacillus*

*cereus*'un gıda zehirlenmesine neden olabilmesi için  $10^5$ - $10^6$  cfu/gr-ml üzerinde sayıda olması gerektiği bildirilmiştir [30,31].

### 1.5. Protein Profil Analizi

Mikroorganizmaların ilk identifikasyon ve sınıflandırma yöntemleri tek tek organizmanın fenotipik özelliklerine dayanmaktaydı. Böylece mikroorganizmalar boyanma özelliği, morfoloji, hareketlilik, besinsel istekler, asit üretimi, pigmentasyon ve spor oluşturma gibi kolaylıkla incelenebilen karakterlere göre sınıflandırılmaktaydı.

Geleneksel taksonomik yöntemlerin sınırlı olduğunun farkına varılması, mikrobiyal identifikasyon ve sınıflandırma işlemlerinin tekrar değerlendirilmesi fikrini ortaya çıkarmıştır. Moleküler identifikasyon ve tiplendirme yöntemlerinin gittikçe artan miktarda kullanımı, yerleşmiş sınıflandırma sistemlerinin gözden geçirilmesine ve mikroorganizmalar arasında yeni ilişkilerin bulunmasına yol açmıştır. Son yıllarda mikrobiyal taksonomistler, türleri tanımlamak ve farklı organizmalar arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak için nükleik asit hibridizasyonu, sekans analizleri ve protein profillerinin elde edilmesi gibi yöntemleri sıklıkla kullanmaya başlamışlardır.

Proteinler tüm canlılarda bir dizi yapısal ve metabolik fonksiyonu sergilemektedir. Bakteriler tarafından üretilen proteinlerin sayısı ve çeşitliliği, protein ve polipeptid profillerinin karşılaştırmalı analizine dayanan identifikasyon ve tiplendirme sistemlerinin geliştirilmesi konusunda bir görüş getirmiştir. Bu yaklaşım tür seviyesine kadar olan bakteriyel identifikasyon ve bakteriyel tür içinde subtiplendirme çalışmalarında başarıyla kullanılmıştır. Genellikle aynı tür tarafından üretilen protein profilleri birbirine çok benzerdir fakat diğer türlerinkinden önemli ölçüde farklıdır. Bir tür içinde, strainler arasındaki en küçük farklılıklar subtiplendirme sisteminin temelini oluşturmaktadır.

Protein profillerinin elde edilmesi öncelikle mikrobiyal proteinin eldesini içermektedir. Bir seri işlem sonunda elde edilen protein örnekleri poliakrilamid veya nişasta gibi jel matriksinde elektroforeze tabi tutulmaktadır. Kullanılan elektroferez sistemine bağlı olarak proteinler büyüklük, elektrik yükü veya

isoelektrik noktaları gibi fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılabilirler. Kullanılan teknikler içinde en yaygın olanı SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) tekniğidir. Bu teknikle proteinler ısı, deterjan ve indirgeme ajanları ile polipeptid üniteleri oluşturmak üzere denature edilip elektroforezde molekül ağırlıklarına göre ayrılmaktadırlar.

Toplam hücre proteinlerinin elektroforezi son yıllarda mikroorganizmaların identifikasyonu ve subtiplendirmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknik ile hem farklı mikroorganizmalar arasında karşılaştırmalı çalışmalar yapılabilmekte hem de akrabalık ilişkileri gözlenebilmektedir [44]. Çok sık kullanılan bir yöntem olmasına rağmen *Bacillus cereus*' un protein profil analizi ile ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır.

Matar ve ark. [45] tarafından yapılan bir çalışmada çevresel ve klinik kaynaklardan elde edilen 58 *Bacillus cereus* izolatu hem biyokimyasal karakterleri yönünden, hem antibiyotik duyarlılıkları yönünden, hem de SDS-PAGE' de oluşturdukları protein profilleri yönünden incelenmiştir. İncelenen tüm izolatlar lesitinaz üretmiş, jelatini hidrolize etmiş, nitratı indirgemiş ve hareketli olarak gözlenmiştir. Bu nedenle de tüm izolatlar tek biyotip altında toplanmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili çalışmada 3 grubun ortaya çıktığı gözlenmiştir. 58 *Bacillus cereus* izolatının 55 tanesi aynı grupta yer alırken, 2 izolat farklı bir grupta ve 1 izolat da daha farklı bir grupta yer almıştır. Total hücre proteinlerinin elektroforezi çalışmaları sonucunda da 58 *Bacillus cereus* izolatu 22 değişik protein profili oluşturarak 22 farklı grup olarak gözlenmişlerdir. Bu şekilde de en küçük farklılıklar değerlendirilerek subtiplendirme çalışmaları yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada *Bacillus cereus* izolatlarının SDS-PAGE' deki protein profillerinin yüksek oranda heterojenite gösterdiği bildirilmiştir.

Gıdaların mikrobiyolojik kalite kontrollerinin, gıda zehirlenmelerinin riskini azaltacağı bilinmektedir. Bu çalışmada da tüketime sunulmuş olan çiğ süt, pastörize süt, peynir ve dondurma gibi gıda örneklerinin hem total mikroorganizma yükü hem de total spor yükü incelenmiştir. Ayrıca potansiyel bir gıda patojeni olan *Bacillus cereus*' un vejetatif hücre ve sporlarının varlığı araştırılmış, identifikasyon için temel yöntemlerin yanısıra modern moleküler tekniklerin de kullanılması amaçlanmıştır.



## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. MATERYAL

#### 2.1.1. Örneklerin Alınması

Eskişehir piyasasında tüketime sunulan 25 dondurma, 27 çiğ süt, 22 pastörize süt ve 24 adet peynir örnekleri (Ağustos 1998–Aralık 1998) steril kaplar içerisine alınmış, etiketlenmiş ve aynı gün buz çantası içinde laboratuvara getirilerek incelenmesi yapılmıştır. Çalışmamızda kullanılan standart *Bacillus cereus* NRRL B 3711 ve *Bacillus sphaericus* NRRL B 4297 United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service' den temin edilmiştir.

#### 2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

##### 2.1.2.1. Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar (PEMBA)

Pepton	1 g
Mannitol	10 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
NaCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g
Bromothymol blue	0.12 g
Sodyum pyruvate	10 g
Agar	18 g
Distile su	900 ml

pH 7.0' ye ayarlanmış ve 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50<sup>0</sup>C' ye kadar soğutulmuş besiyeri üzerinde 100 ml egg-yolk emulsiyonu ve 100 IU/ml polymyxin B antibiyotiği ilave edilerek steril petrilere dökülmüştür [37].

### 2.1.2.2. Triptose Blood Agar Base

Triptose	10 g
Lab-Lemco powder	5 g
NaCl	3 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml

Malzemeler distile suda eritilip otoklavda steril edildikten sonra 45-50<sup>0</sup>C'ye kadar soğutulmuş ve %5 steril kan ilave edilerek petrilere dökülmüştür [39].

### 2.1.2.3. Mannitol Egg Yolk Polymyxin B Agar (MYP)

Pepton	10 g
Meat extract	1 g
D-mannitol	10 g
NaCl	10 g
Fenol red	0.025 g
Agar	12 g
Distile su	900 ml

pH 7.1' e tamponlanmış, 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 45-50<sup>0</sup>C' ye soğutulan besiyerine 100 ml egg-yolk emulsiyonu ve 0,1 gr Polymyxin B sülfat antibiyotiği ilave edilerek steril petrilere dökülmüştür [46].

### 2.1.2.4. Egg Yolk Emulsiyonu

Aseptik koşullarda yumurtanın sarısı beyazından ayrılarak 1:1 oranında % 0.85 NaCl ile karıştırılmış ve yüksek devirli blanderde homojen hale getirilerek kullanılmıştır [46].

### 2.1.2.5. Plate Count Agar

Tripton	5 g
Glukoz	1 g
Yeast extract	2.5 g
Agar	15 g

Bu maddeler 1lt distile suda eritilerek pH' sı 7.2' ye tamponlanmış ve 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [47].

### 2.1.2.6. % 0,85 NaCl

NaCl	0.85 g
Distile su	100 ml

121<sup>0</sup>C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [47].

### 2.1.2.7. MR-VP Broth

Proteose pepton	7 g
Glukoz	5 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

pH 7.0' ye ayarlanarak tüplere 5' er ml dağıtılmış ve otoklavda 15 dakika steril edilmiştir [47].

### 2.1.2.8. Glukoz Broth

Beef extract	0.3 g
Pepton	0.5 g
Glukoz	0.5 g

100 ml distile su ve 0.0025 gr fenol red ilave edilerek tüplere 10' ar ml dağıtılmış, Durham tüpleri de eklenerek 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [47].

#### 2.1.2.9. Nitrat Broth

Beef extract	0.3 g
Pepton	0.5 g
KNO <sub>3</sub>	0.5 g
Distile su	100 ml

Malzemeler distile su içinde çözüldürülmüş, 5'er ml olarak tüplere aktarılarak 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [47].

#### 2.1.2.10. Nütrient Agar

Beef extract	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g

1 litre distile su içinde eritilerek pH' ı 7.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika otoklavlanarak kullanılmıştır [47].

#### 2.1.2.11. Nütrient Broth

Beef extract	0.3 g
Pepton	0.5 g

100 ml distile suda çözümlenerek 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika steril edilerek kullanılmıştır [47].

### 2.1.2.12. Pepton Salin Solüsyonu

Pepton	10 g
NaCl	5 g

1 litre distile suda çözülerek pH' sı 7.2' ye tamponlanmış ve 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika otoklavlanarak kullanılmıştır [47].

### 2.1.2.13. Kristal Viyole Solüsyonu

Kristal viyole	2 g
Etil alkol	20 ml
Amonyum oxalat	0.8 g

Tüm maddeler 80 ml distile su içinde çözündürülerek kullanılmıştır [47].

### 2.1.2.14. İyot Solüsyonu

İyot	1 g
Potasyum İyodür	2 g

Malzemeler 300 ml distile su ile çözülerek kullanılmıştır [47].

### 2.1.2.15. Safranin Solüsyonu

Safranin	0.25 g
Etanol	10 ml
Distile su	90 ml

Safranin etanolde çözülmüş, distile su ile karıştırılarak filtre kağıdından süzülmüştür [47].

### 2.1.2.16. $\alpha$ -Naftol Solüsyonu

$\alpha$ -Naftol	5 g
% 95' lik etil alkol	100 ml

$\alpha$ -Naftol alkolde çözüdürülerek kullanılmıştır [47].

### 2.1.2.17. $\alpha$ -Naftilamin Solüsyonu

$\alpha$ -Naftilamin	0.5 g
5N Asetik Asit	100 ml

$\alpha$ -Naftilamin asetik asitte çözüdürülerek hazırlanmıştır [47].

### 2.1.2.18. Sülfanilik Asit Çözeltisi

Sülfanilik asit	1 g
5N Asetik asit	125 ml

Sülfanilik asit asetik asit içinde homojen olarak çözüdürülerek hazırlanmıştır [47].

### 2.1.2.19. % 40' lık KOH (Potasyum Hidroksit) Çözeltisi

KOH	40 g
Kreatin	0.3 g
Distile su	100 ml

KOH distile suda iyice çözüdürülmüş, daha sonra kreatin ilave edilmiştir [47].

### 2.1.2.20. BSA Stok Solüsyonu

1 mg Bovin Serum Albumin (Sigma A 7906) 1 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan Bovin Serum Albumin stok solüsyonu +4°C' de muhafaza edilmiştir [48].

### 2.1.2.21. Tampon A

SDS (Sigma L 4509)	% 10
Gliserol (Sigma G 8773)	% 10
$\beta$ -merkaptoetanol (Sigma M 7154)	% 5
Tris-HCl (Sigma T 8529)	0.05 M

100 ml' ye distile su ile tamamlanarak pH' sı 6,8' e ayarlanmış ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [45].

### 2.1.2.22. Tampon B

$\beta$ -merkaptoetanol	% 5
Gliserol	% 10
Tris (Sigma T 8404)	0.062 M
EDTA (Sigma E 5513)	0.05 M

100 ml'ye distile su ile tamamlanarak pH' sı 6,8' e ayarlanmış ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [49].

### 2.1.2.23. Lizozim Solüsyonu

Lizozim (Sigma L 7651)	1 mg
Tris (Sigma T 8404)	0.05 M

Lizozim 0,1 ml Tris çözeltisinde çözündürülmüş, pH'sı 7.0' ye ayarlanarak kullanılmıştır [49].

#### 2.1.2.24. Tris Citrate

Tris (Sigma T 8404)	12.1 g
Sitrik asit	6.6 g
Distile su	1000 ml

pH' sı 7.0' ye ayarlanarak otoklavda steril edilmiş ve +4<sup>0</sup>C' de muhafaza edilmiştir [44].

#### 2.1.2.25. % 30 Acrylamide Karışımı

Acrylamide (Sigma A 3553)	% 29
N,N'-metilenbisacrylamide (Sigma M 7279)	% 1

100 ml' ye deiyonize sıcak su ile tamamlanarak kullanılmıştır [50].

#### 2.1.2.26. 1,5 M Tris

Tris (Sigma T 8404)	18.15 g
Distile su	100 ml

pH' sı 8.8' e ayarlanarak otoklavlanmıştır [50].

#### 2.1.2.27. 1M Tris

Tris (Sigma T 8404)	12.1 g
Distile su	100 ml



pH' sı 6.8' e ayarlanarak otoklavlanmıştır [50].

#### 2.1.2.28. % 10 SDS

SDS (Sigma L 4509) 10 g

100 ml' ye distile su ile tamamlanarak 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [50].

#### 2.1.2.29. % 10 AMPS Solüsyonu

Amonyumpersülfat (Sigma A 3678) 1 g

10 ml deiyonize suda Amonyumpersülfat çözülmüş ve +4<sup>0</sup>C' de muhafaza edilmiştir [50].

#### 2.1.2.30. % 10' luk Ayırma Jeli (10 ml)

Distile su	4 ml
% 30 acrylamide karışımı (2.1.2.25)	3.3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8) (2.1.2.26)	2.5 ml
% 10 SDS (Sigma L 4509)	0.1 ml
% 10 AMPS (Sigma A 3678)	0.1 ml
TEMED (Sigma T 9281)	0.004 ml

Tüm malzemeler sırayla steril mavi ve sarı uçlar aracılığıyla temiz bir şişeye aktarılarak jel donmadan elektoroferez aygıtına boşaltılmıştır [50].

#### 2.1.2.31. % 5' lik Yükleme Jeli (3 ml)

Distile su 2.1 ml

% 30 acrylamide karışımı (2.1.2.25)	0.5 ml
1,0 M Tris (pH 6,8) (2.1.2.27)	0.38 ml
% 10 SDS (Sigma L 4509)	0.03 ml
% 10 AMPS (Sigma A 3678)	0.03 ml
TEMED (Sigma T 9281)	0.003 ml

Tüm malzemeler sırayla steril mavi ve sarı uçlar kullanılarak temiz bir şişeye aktarılıp yavaşça karıştırılmış, jel donmadan elektroforez aygıtına boşaltılmıştır [50].

### 2.1.2.32. 2X SDS Jel Yükleme Tamponu

Tris HCL (Sigma T 8529)	100 mM
Dithiothreitol (Sigma D 9163)	200 mM
SDS	% 4
Bromophenol blue (Sigma B 8026)	% 2
Gliserol	% 20

Yukarıdaki maddeler karıştırılarak hazırlanmış ve +4<sup>0</sup>C' de muhafaza edilmiştir [50].

### 2.1.2.33. 5X Yürütme Tamponu

Tris (Sigma T 8404)	15.1 g
Glisin (Sigma G 8898)	94 g
Deiyonize su	900 ml
% 10 SDS (2.1.2.28)	50 ml

Tris ve Glisin deiyonize suda çözüldükten sonra SDS ilave edilerek 1000 ml'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır [50].

**2.1.2.34. Coomasie Brilliant Blue ( Jel Boyası )**

Coomasie Brilliant blue R (Sigma B 8647)	0.25 g
Metanol	45 ml
Distile su	45 ml
Glacial asetik asit	10 ml

Hazırlanan solüsyon Whatman No.1 filtre kağıdından süzölmüştür [50].

**2.1.2.35. Yıkama Tamponu**

Metanol	30 ml
Asetik asit	10 ml
Distile su	60 ml

Yukarıdaki maddeler karıştırılarak elde edilmiştir [50].

**2.1.2.36. Jel Koruma Solüsyonu**

Glacial asetik asit	140 ml
Distile su	860 ml

Maddeler karıştırılarak elde edilmiştir [51].

## 2.2. YÖNTEM

### 2.2.1. *Bacillus cereus* İzolasyonu İçin Uygun Besi Ortamının Belirlenmesi

MYP, PEMBA ve Tryptose Blood Agar *Bacillus cereus*' un izolasyonunda en çok kullanılan besiyerleridir. Bu çalışmada, gıda maddelerinin analizinde hangi besiyerinin kullanılacağını belirlemek üzere ilk 4 gıda örneği her 3 besiyerine de ekilmiş ve en iyi sonuç alınan besiyeri bundan sonraki gıda örneklerinde *Bacillus cereus*' un izolasyonu için kullanılmıştır.

### 2.2.2. Dondurma Örneklerinin İncelenmesi

Steril beherler içerisinde alınan dondurma örneklerinden sıvı hale geldikten sonra steril distile su içerisinde  $10^{-5}$ ' e kadar dilüsyonlar hazırlanmış ve bu dilüsyonların tümünden toplam bakteri sayımı için PCA' ya 20µl şeklinde damla ekimler, *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayımı ve izolasyonu için de MYP agara 100µl yayma ekim yapılmıştır [19,21].

Toplam spor sayımı ve *Bacillus cereus* sporları sayımı ve izolasyonu içinse, dondurma örnekleri  $80^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika tutularak PCA' ya 20µl damla ekimler ve MYP agara da 100µl yayma ekim yapılmıştır. Tüm ekimler duplike olarak gerçekleştirilmiştir [19,21].

PCA ve MYP petripleri  $30^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlanmış etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon süresi sonunda petriler incelenerek sayım ve izolasyonlar yapılmıştır [19,21].

### 2.2.3. Çiğ Süt Örneklerinin İncelenmesi

Steril kavanozlar içerisinde ortalama 100 ml hacimlerde alınan süt örnekleri aynı gün laboratuvara getirilerek ekimleri yapılmıştır.

Süt örneklerinin pepton salin solüsyonu (PSS) içerisinde  $10^{-5}$ ' e kadar dilüsyonları hazırlanmış, tüm dilüsyonlardan PCA' ya 20µl damlatılarak toplam

bakteri sayımı yapılmıştır. Toplam spor sayımı içinse, süt örnekleri 80°C' ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika bekletilmiş ve aynı şekilde dilüsyonları hazırlanarak PCA' ya 20 µl damla ekimleri yapılmıştır.

*Bacillus cereus* vejetatif hücre sayımı için süt örnekleri duplike şekilde 10 ml steril santrifüj tüplerine alınarak 2000g' de 30 dakika santrifüj edilmiş, pelet 1 ml pepton salin solüsyonunda çözülerek MYP agara 500µl yayma ekimleri yapılmıştır. *Bacillus cereus* sporlarının sayımı içinse yine süt örneği 80°C' de 10 dakika bekletilerek 1 ml ve 0,1 ml örnekler MYP agara direk yayma ekimle ekilmiştir [21,23].

PCA ve MYP petrileri 30°C' de 24 saat inkübasyondan sonra incelenmiş ve hem toplam bakteri ve toplam spor sayımları hem de *Bacillus cereus* ve sporu sayımları yapılmıştır [21,23].

#### **2.2.4. Pastörize Süt Örneklerinin İncelenmesi**

Süt örnekleri kendi kapları içinde laboratuvara getirilerek aynı gün içinde incelemeye alınmıştır.

Süt örnekleri dilüsyonları yapılmadan direk olarak 500 µl alınarak PCA' ya yayılmış ve toplam bakteri sayımı bulunmuştur.

*Bacillus cereus* sayımı içinse 10 ml (duplike) süt örnekleri 2000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve pelet 1 ml pepton salin solüsyonunda çözülerek 0.5 ml ve 0.2 ml alınıp MYP agara yayma ekim yapılmıştır [21,23].

Ekim yapılmış PCA ve MYP petrileri 30°C' de 24 saat inkübasyondan sonra incelenerek toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* ve sporlarının sayımı yapılmıştır [21,23].

#### **2.2.5. Peynir Örneklerinin İncelenmesi**

Steril petri kabına alınan peynir örnekleri aynı gün laboratuvarda incelenmiştir.

20 gr peynir örneği 180 ml % 0.1' lik peptonlu suda 30 saniye yüksek devirde blanderda homojen hale getirilmiştir. Buradan  $10^{-5}$ ' e kadar dilüsyonlar hazırlanarak tümünden PCA' ya damla ekimler yapılmıştır. Homojenat  $80^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakika su banyosunda tutularak spor sayımı için  $10^{-2}$ ' ye kadar dilüsyonlar hazırlanmış ve PCA' ya 20 µl damla ekimler yapılmıştır.

*Bacillus cereus* vejetatif hücre sayımı için homojen hale getirilmiş örnekten 1 ml alınarak MYP' ye yayma ekim yapılmıştır. Örnek  $80^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakika bekletilip yine MYP' ye 1 ml yayma ekim yapılarak *Bacillus cereus* sporu sayımına ulaşılmıştır. Ekim yapılmış petriler  $30^{\circ}\text{C}$ ' de 24 saat inkübasyondan sonra incelenerek toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* vejetatif ve *Bacillus cereus* sporlarının sayımı yapılmıştır [26,38].

Tüm gıda örneklerinin incelenmesi sonucunda MYP agardaki tipik *Bacillus cereus* kolonileri, izolasyon testlerine alınmak üzere yatık nütrient agarda ve % 15' lik gliserolde stoklanmıştır. Nütrient agar tüpleri  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de, gliserol stokları ise  $-85^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilmiştir.

## 2.2.6. Elde Edilen İzolatlara Uygulanan İdentifikasyon Testleri

MYP agar üzerinde tipik *Bacillus cereus* görünümü veren izolatların saflığı kontrol edildikten sonra aşağıdaki identifikasyon testlerine alınmışlardır.

### 2.2.6.1. Gram Boyama

Lam üzerinde tespit edilmiş preparat üzerine kristal viyole ve lugol uygulandıktan sonra % 95' lik alkol ile renksizleştirme işlemi yapılmıştır. Daha sonra safranin uygulanmış, boya yıkandıktan sonra preparat kurutulmuş ve immersiye yağ damlatılarak 100' lük objektifte incelenmiştir [47].

### 2.2.6.2. Glukozdan Asit ve Gaz Oluşturma

Taze bakteri kültürleri, içerisinde Durham tüpleri bulunan glukoz broth besiyerlerine ekilerek 24 saat  $30^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda tüpler

asit ve gaz oluşumu yönünden incelenmiştir. Besiyerinin renginin sarıya dönmesi asit üretimi pozitif, durham tüplerinde hava kabarcıklarının varlığı da gaz oluşumu pozitif olarak kaydedilmiştir [47].

#### **2.2.6.3. Nitrat Redüksiyonu**

Nitrat broth içeren tüplere taze bakteri kolonileri inoküle edilerek kültürler 30<sup>0</sup>C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürler üzerine 250 µl sülfanilik asit çözeltisi ve 250 µl α-naftilamin solüsyonu damlatılarak 10 dakika içerisinde besiyerinde kırmızı-kahverengi renk oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir [47].

#### **2.2.6.4. Voges Proskauer Reaksiyonu**

MR-VP broth (Glukozlu Fosfatlı Buyyon) içeren tüplere bakteri kolonileri inoküle edilerek kültürler 30<sup>0</sup>C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında temiz bir tüpe aktarılmış 3 ml kültür üzerine 1.8 ml α-naphtol solüsyonu ve 0.6 ml % 40' lık KOH damlatılarak pembe renk oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir [47].

#### **2.2.6.5. Hemoliz Testi**

% 5 steril kan içeren tryptose blood agar besiyerine izolatlardan ekim yapılmış, inkübasyon süresi sonunda koloniler etrafında şeffaf bir zon oluşup oluşmadığına bakılmıştır [39].

#### **2.2.6.6. Katalaz Testi**

Nütrient agarda geliştirilen kolonilerin üzerine % 3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi damlatılarak gaz çıkışı pozitif olarak değerlendirilmiştir [47].

### 2.2.6.7. Nütrient Agarda Üreme

Bakteri kültürü nütrient agara ekilerek 24 saat inkübasyon sonrasında üreme şekli ve koloni morfolojisi incelenmiştir [39].

### 2.2.7. Total Hücre Proteinlerinin Elde Edilmesi

Total hücre proteinlerinin elde edilebilmesi için öncelikle 3 farklı yöntem denenerek en uygun yöntem seçilmeye çalışılmıştır.

1. yöntemde [45] bakteri kültürü nütrient agar üzerinde geliştirilerek 1 temsilci koloni alınmış ve içerisinde 25 µl Tampon A (0.5 M Tris HCl, %10 SDS, %10 Gliserol, %5 β-merkaptöetanol, pH 6.8) bulunan Ependorfa eklenmiştir. Ependorf 10 dakika kaynatılarak içerisinde 25 µl distile su ilave edilmiştir. 1 dakika 12.000 rpm (+4°C) santrifugasyon işleminden sonra süpernatant başka bir Ependorf tüpüne aktararak -20°C' de muhafaza edilmiştir.

2. yöntemde [49] bakteri kültürü nütrient agarda geliştirilerek kürdan yardımıyla Ependorf tüplerine yaklaşık 50 mg olacak şekilde tartılmıştır. Ependorf tüplerine 900 µl Tampon B (%5 β-merkaptöetanol, %10 Gliserol, 0.062 M Tris, 0.05 M EDTA, pH 6.8) eklenerek süspansiyon haline getirildikten sonra üzerine 10 µl lizozim solüsyonu eklenmiş ve 37°C' de 40-45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra Ependorf üzerine 100 µl % 20' lik SDS eklenerek 10 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra tüpler 10.000 g'de 10 dakika +4°C' de santrifüj edilerek süpernatant ayrı bir Ependorfa alınmış ve -20°C' de muhafaza edilmiştir.

3. yöntemde [44] bakteri hücreleri öncelikle katı besi ortamında aktif hale getirilmiş sonra da 100 ml nütrient broth içine yoğun aşılama yapılarak çalkalamalı etüvde (30°C) 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra steril santrifüj tüplerinde 10.000 rpm' de 10 dakika +4°C' de santrifugasyon yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine 8 mg lizozim ve 4 ml Tris-citrate tamponundan ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpler vortex ve elde hafifçe karıştırılarak homojen süspansiyon haline



getirilmiştir. Sonikatör şişelerine aktarılan süspansiyonlar 3sn – 3sn periyotlarda buz üzerinde 5-6 dakika sonike edildikten sonra kırılma 40X objektifle gözlenmiştir. Elde edilen süspansiyon 20.000 g' de 20 dakika +4<sup>0</sup>C' de santrifüj edilmiş, pelete dokunulmadan sadece süpernatant kısmı küçük hacimler halinde Ependorflara paylaştırılmış, etiketlenmiş ve -20<sup>0</sup>C' de muhafaza edilmiştir.

Yukarıda verilen 3 yöntem ile elde edilen protein örneklerinde protein miktarlarının tayini için Bradford yöntemi [48] kullanılmıştır. Standart olarak 1 mg/ml Bovin Serum Albumin (BSA) stok solüsyonu seçilmiştir. Belirli protein miktarlarına karşılık gelen absorbans değerleri 595 nm' de okunarak standart eğri çıkartılmış ve protein miktarı bilinmeyen örnek için elde edilen absorbans değerleri bu eğriyle karşılaştırılarak protein miktarı tayin edilmiştir.

### 2.2.8. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

Elektroföze için gerekli olan malzemeler hazırlandıktan sonra tümü uygun ortamlarda muhafaza edilmiştir. Elektroföze tankı uygun biçimde kurulduktan sonra jelin hazırlanması [50] işlemine geçilmiştir.

% 10' luk 10 ml ayırma jelinin hazırlanması için gerekli olan H<sub>2</sub>O, % 30 akrilamid karışımı, 1.5 M Tris (pH 8.8), % 10 SDS, % 10 AMPS ve TEMED materyal bölümünde belirtildiği miktarlarda steril mavi ve sarı uçlar aracılığıyla temiz bir tüp içinde hazırlanmış ve sonra da jel aygıtına karışım boşaltılmıştır. Düz bir yüzey elde etmek için dökülen jel üzerine su ile doyurulmuş bütanolden 4-5 damla ilave edilmiştir. Jel donduktan sonra bütanol distile su ile temizlenmiş ve kurutma kağıdı aracılığıyla da su alınmıştır.

3 ml yükleme jelinin hazırlanması için gerekli olan H<sub>2</sub>O, % 30 akrilamid karışımı, 1 M Tris (pH 6.8), % 10 SDS, % 10 AMPS ve TEMED gerekli miktarlarda steril mavi ve sarı uçlar aracılığıyla hazırlanmış ve donmuş olan yükleme jelinin üzerine dökülmüştür. Bu işlemi takiben 12 çukurlu tarak jelle yerleştirilmiştir. Yükleme jeli kuruduktan sonra 1X yürütme tamponu ile elektroföze tankı doldurulmuş, tarak jeli bozmayacak şekilde dikkatlice çıkarılmış ve tarağın oluşturduğu çukurlara numara verilmiştir.

Jel dökme işlemi bittikten sonra yürütülecek protein örnekleri ve işaretleyici protein temiz Ependorf tüpleri içinde hazırlanmıştır. Jel çukurlarına yüklenen protein miktarının 25 µg/30 µl – 30 µg/30 µl arasında olmasına özen gösterilmiştir.

30 µl protein örneğinin üzerine 10 µl 2X jel yükleme tamponu ilave edilerek toplam 40 µl hacim elde edilmiştir. Benzer şekilde 5 µl geniş aralıklı işaretleyici protein (Sigma M 4038) üzerine 10 µl 2X jel yükleme tamponu ve 25 µl distile su ilave edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan protein örnekleri 2-3 dakika kaynayan su içinde bekletilmiş ve Ependorflarda toplanan su buharını toplamak için 12.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Hazırlanan protein örnekleri Hamilton şırınga yardımı ile donmuş jelde oluşmuş çukurlara aktarılmış ve 80 V' luk elektrik akımı uygulanarak elektroforeze tabi tutulmuştur. Boya ayırma jelinin başlangıç çizgisine geldiğinde güç kaynağı 140 V' a ayarlanmıştır. Boya jelin sonuna ulaştığında elektroforeze son verilmiş ve jel elektroforez tankından çıkarılmıştır. Temiz bir kaba alınan jel, jel boyası (Coomasie Brilliant Blue) ile 2 saat boyanmıştır. Boyama işleminden sonra yıkama tamponu içine konulan jel bir gece boyunca hafifçe çalkalanarak fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra jel, koruma solüsyonu içine alınarak fotoğrafları çekilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *Bacillus cereus* İzolasyonu İçin Uygun Besi Ortamının Belirlenmesi

Çalışmanın başlangıcında *Bacillus cereus*' un izolasyonu için 3 ayrı besiyeri kullanılarak en uygun besiyerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle *Bacillus cereus*' un izolasyonunda sıklıkla kullanılan MYP, PEMBA, Tryptose Blood Agar besiyerleri karşılaştırılmıştır. (Çizelge 3.1.)

Çizelge 3.1. MYP, PEMBA ve Tryptose Blood Agar besiyerlerinin dondurma örneklerinden *Bacillus cereus* izolasyonu yönünden karşılaştırılması.

Örnek No	PEMBA	MYP	Tryptose Blood Agar
1A	-	-	1 cfu/ml
1B	-	-	2 cfu/ml
1C	$2 \times 10^3$ cfu/ml	$5 \times 10^3$ cfu/ml	$1 \times 10^5$ cfu/ml
1D	$1 \times 10^3$ cfu/ml	$1.5 \times 10^3$ cfu/ml	$1 \times 10^4$ cfu/ml

Dondurma örnekleri 1A ve 1B, PEMBA ve MYP besi ortamında hiç koloni oluşturmaz iken, Tryptose Blood Agar' da sırasıyla 1 ve 2 koloni oluşturmuşlardır. Buna karşın örnek 1C ve 1D örnekleri her üç besiyerinde de koloni oluşturmuş ve Tryptose Blood Agar' dan sonra MYP agar üzerinde daha fazla koloni gözlenmiştir (Çizelge 3.1). Ancak yapılan çalışmalar [10,16] Tryptose Blood Agar' ın *Bacillus cereus*' un izolasyonu için çok seçici bir besiyeri olmadığını göstermektedir. MYP ve PEMBA izolasyon yönünden çok büyük farklılıklar göstermemektedir. Bu nedenle bundan sonraki işlemlerde *Bacillus cereus* izolasyonu için MYP agar besiyeri kullanılmıştır.

Gıda örneklerinden besiyerine ekimler yapılarak  $30^{\circ}\text{C}$ ' de 24 saat inkübasyon sonrasında MYP agar üzerinde krem renkli, etraflarını ve besiyerini pembeye boyamış ve çevrelerinde presipitasyon halkası oluşturmuş koloniler *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır. Bu koloniler saflaştırılarak nütrient agar içeren yatık tüplere stoklanmıştır. Ayrıca % 15' lik gliserol içinde stokları hazırlanarak  $-85^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

## 3.2. İncelenen Örneklerdeki Mikroorganizma Sayıları

### 3.2.1. Dondurma Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları

Bu çalışmada 11 farklı pastaneden alınan 25 adet dondurma örneği incelenmiş, dondurma örneklerindeki vejetatif hücrelerden ve spordardan elde edilen izolatlar 1 ile simgelenip; spor sayımından saflaştırılan izolatlar ise S ile belirtilmiştir. İncelenen dondurma örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* sporlarının sayıları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. İncelenen örneklerdeki en düşük toplam bakteri sayısı 1N örneğinde gözlenmiş ve  $5 \times 10^2$  cfu/ml olarak belirlenmiştir. En yüksek sayım ise  $8.5 \times 10^8$  cfu/ml olarak 1K örneğinde bulunmuştur. Ortalama olarak toplam bakteri sayıları  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  cfu/ml olarak kaydedilmiştir. Toplam spor sayımlarında ise 4 örnekte (1B,1P,1R,1V) spor saptanamamış, en düşük spor sayısı  $1 \times 10$  cfu/ml ile 1O örneğinde gözlenmiş, en yüksek spor sayısı ise  $8.3 \times 10^6$  cfu/ml olarak 1D örneğinde bulunmuştur. Ancak ortalama spor sayıları genellikle  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  cfu/ml düzeylerinde elde edilmiştir.

İncelenen 25 dondurma örneğinin 7 tanesinde (Örnek no 1A,1B,1C,1D,1G,1Ş,1Y) yani % 28' inde *Bacillus cereus* olarak değerlendirilen kolonilere rastlanmıştır. 5 dondurma örneğinde de (1A,1C,1F,1G,1Y) (% 20) *Bacillus cereus* sporları belirlenmiştir. *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve sporlarının sayısı ise  $1 \times 10$  (Örnek no 1Ş) ile  $3 \times 10^3$  (Örnek no 1C) cfu/ml arasında belirlenmiştir.

25 dondurma örneğinin incelenmesi sonucunda elde edilen veriler, toplam bakteri yükü açısından tüketime sunulmuş olan dondurmaların 11 adedinin (% 44' ünün) gıda tüzüğüne uygun olmadığını göstermektedir. *Bacillus cereus*' un gerek vejetatif hücre ve gerekse spor sayımları ise bakteri düzeyinin gıda zehirlenmesi oluşturabilecek durumda olmadığını göstermektedir. Çünkü *Bacillus cereus*' un gıda zehirlenmesi oluşturabilmesi için  $10^5$ - $10^6$  cfu/ml düzeylerinde bulunması gerekmektedir.

Çizelge 3.2. Dondurma örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* sporlarının sayısı

Örnek	Toplam Bakteri Sayısı cfu/ml	Toplam Spor Sayısı cfu/ml	<i>Bacillus cereus</i> Vejetatif hücre Sayısı cfu/ml	<i>Bacillus cereus</i> Spor Sayısı cfu/ml
1A	2.1x10 <sup>5</sup>	5x10	2x10	2x10
1B	4.3x10 <sup>5</sup>	-	2x10	-
1C	2.2x10 <sup>8</sup>	3.5x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>
1D	2.9x10 <sup>8</sup>	8.3x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>2</sup>	-
1E	2.1x10 <sup>5</sup>	4.5x10 <sup>4</sup>	-	-
1F	1.2x10 <sup>5</sup>	5.5x10 <sup>4</sup>	-	1x10
1G	1x10 <sup>6</sup>	7.5x10 <sup>3</sup>	1.5x10 <sup>2</sup>	3x10 <sup>2</sup>
1H	1.4x10 <sup>6</sup>	4.5x10 <sup>3</sup>	-	-
1I	2.25x10 <sup>5</sup>	2.5x10 <sup>2</sup>	-	-
1J	1.2x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>3</sup>	-	-
1K	8.5x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>5</sup>	-	-
1L	1.65x10 <sup>6</sup>	1.7x10 <sup>4</sup>	-	-
1M	3x10 <sup>3</sup>	2.5x10 <sup>2</sup>	-	-
1N	5x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>4</sup>	-	-
1O	3.5x10 <sup>3</sup>	1x10	-	-
1Ö	1.35x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>2</sup>	-	-
1P	1.5x10 <sup>5</sup>	-	-	-
1R	1.5x10 <sup>5</sup>	-	-	-
1S	1.6x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>3</sup>	-	-
1Ş	2.5x10 <sup>7</sup>	8.5x10 <sup>4</sup>	1x10	-
1T	3x10 <sup>7</sup>	8.5x10 <sup>4</sup>	-	-
1U	8.5x10 <sup>5</sup>	2.5x10 <sup>2</sup>	-	-
1V	1.5x10 <sup>4</sup>	-	-	-
1Y	1.55x10 <sup>6</sup>	2.5x10 <sup>2</sup>	3x10	5
1Z	4.5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>4</sup>	-	-

### 3.2.2. Çiğ Süt Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları

27 adet çiğ süt örneğinin incelendiği çalışmada çiğ süt örnekleri 2 ile simgelenmiştir S ise sporları belirtmektedir. Çiğ süt örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* sporlarının sayıları Çizelge 3.3.' de verilmiştir. Çiğ süt örneklerindeki en düşük toplam bakteri sayısı 2L örneğinde gözlenmiş ve  $7 \times 10^5$  cfu/ml olarak belirlenmiştir. En yüksek toplam bakteri sayımı ise  $4 \times 10^8$  cfu/ml ile 2B örneğinde bulunmuştur. İncelenen diğer örneklerdeki toplam bakteri sayıları ise, ortalama  $10^6$ ,  $10^7$  cfu/ml arasında değişmiştir. Toplam spor sayımları incelendiğinde ise  $2.5 \times 10$  cfu/ml en düşük spor sayımı olarak 2π örneğinde bulunmuştur. En yüksek spor sayımı ise  $1.4 \times 10^4$  cfu/ml ile 2O örneğinde kaydedilmiştir. Ortalama spor sayısı ise  $10^2$ - $10^3$  cfu/ml arasında elde edilmiştir. 1 örnekte ise (2İ) spor sayımı elde edilememiştir.

İncelenen 27 adet çiğ süt örneğinin 3 tanesinde (2X,2Y,2Z) yani % 11.1' inde *Bacillus cereus* olarak tanımlanan kolonilere rastlanmıştır ve *Bacillus cereus* sayıları 25 cfu/10 ml, 3 cfu/10 ml, 12 cfu/10 ml olarak belirlenmiştir. *Bacillus cereus* sporlarına ise 15 çiğ süt örneğinde (% 55.5) rastlanmıştır. Ancak *Bacillus cereus* sporları sayısı oldukça düşük bulunmuştur (1-30 cfu/ml).

İncelenen çiğ süt örneklerinin *Bacillus cereus* sayısının gıda zehirlenmesi oluşturabilecek düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Ancak genel olarak örneklerdeki toplam bakteri ve spor sayılarının yüksek düzeylerde olduğu görülmektedir.

### 3.2.3. Pastörize Süt Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları

22 adet pastörize süt örneğinin incelendiği bu çalışmada pastörize süt örnekleri 3 ile simgelenmiştir. İncelenen pastörize süt örneklerindeki toplam bakteri ve toplam *Bacillus cereus* sayıları Çizelge 3.4.' te verilmiştir. Pastörize sütün tüketime sunulmadan önce bir ısısız işleme tabi tutulduğu bilindiği için tekrar bir  $80^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakikalık ısı muamelesi yapılmamıştır. Pastörize süt örneklerindeki en düşük toplam bakteri sayısı  $1.8 \times 10$  cfu/ml olarak 3N örneğinden elde edilmiştir. En yüksek sayım ise  $2.34 \times 10^3$  cfu/ml ile 3M örneğinde

bulunmuştur. Ancak ortalama  $5 \times 10^1 - 1.5 \times 10^2$  cfu/ml arasında sayımlar elde edilmiştir.

İncelenen 22 adet pastörize süt örneğinin 19 tanesinde (% 86.36) *Bacillus cereus* olarak tanımlanan kolonilere rastlanmıştır. Oran yüksek olmasına rağmen pastörize süt örneklerindeki toplam bakteri sayılarının ve *Bacillus cereus* sayılarının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir.

#### 3.2.4. Peynir Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları

24 adet peynir örneğinin incelendiği çalışmada peynir örnekleri 4 ile simgelenmiş, sporelerden elde edilen izolatlar S ile de belirtilmiştir. İncelenen peynir örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* sporlarının sayımları Çizelge 3.5.' te verilmiştir. İncelenen peynir örneklerindeki en düşük toplam bakteri sayısı  $2.5 \times 10^2$  cfu/ml ile 4H örneğinden elde edilmiştir. En yüksek sayım ise  $2.5 \times 10^8$  cfu/ml ile 4C örneğinde gözlenmiştir. Ortalama olarak ise  $10^6 - 10^7$  cfu/ml arasında toplam bakteri sayımları elde edilmiştir. Toplam spor sayımı ise ortalama  $2 \times 10^1 - 2 \times 10^2$  cfu/ml arasında belirlenmiştir.

İncelenen 24 peynir örneğinin 9 tanesinde (% 12.5) *Bacillus cereus* olarak tanımlanan kolonilere rastlanmıştır. 3 peynir örneğinde ise (% 12.5) *Bacillus cereus* sporu sayılmıştır. Ancak örneklerde belirlenen *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* sporlarının sayısı oldukça düşük bulunmuştur (1-19 cfu/ml).

Çizelge 3.3. Çiğ süt örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* sporlarının sayısı

Örnek	Toplam Bakteri Sayısı cfu/ml	Toplam Spor Sayısı cfu/ml	<i>Bacillus cereus</i> Vejetatif hücre Sayısı cfu/10ml	<i>Bacillus cereus</i> Spor Sayısı cfu/ml
2A	8.5x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>3</sup>	-	-
2B	4x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>3</sup>	-	1
2C	1.7x10 <sup>8</sup>	2.5x10 <sup>3</sup>	-	-
2D	1.6x10 <sup>8</sup>	4.5x10 <sup>3</sup>	-	-
2E	9x10 <sup>7</sup>	3.5x10 <sup>3</sup>	-	5
2F	1.65x10 <sup>8</sup>	6.5x10 <sup>3</sup>	-	19
2G	1.1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>2</sup>	-	-
2H	2.5x10 <sup>7</sup>	6x10 <sup>2</sup>	-	-
2I	2.1x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>2</sup>	-	20
2İ	2.05x10 <sup>7</sup>	-	-	-
2J	1.95x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>3</sup>	-	24
2K	1.65x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>3</sup>	-	1
2L	7x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>3</sup>	-	2
2M	7x10 <sup>6</sup>	8.5x10 <sup>3</sup>	-	-
2N	1.35x10 <sup>8</sup>	3x10 <sup>3</sup>	-	4
2O	5x10 <sup>6</sup>	1.4x10 <sup>4</sup>	-	13
2P	7.5x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>3</sup>	-	30
2R	1.65x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>2</sup>	-	-
2S	4x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>2</sup>	-	-
2T	3.5x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>3</sup>	-	5
2U	1.2x10 <sup>7</sup>	5x10	-	-
2V	1.2x10 <sup>6</sup>	2.5x10	25	1
2Y	9.5x10 <sup>6</sup>	2.5x10	3	-
2Z	7x10 <sup>6</sup>	2.5x10	12	2
2W	1.05x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>2</sup>	-	1.5
2X	1.2x10 <sup>8</sup>	5x10	-	1
2π	9x10 <sup>5</sup>	2.5x10	-	-



Çizelge 3.4. Pastörize süt örneklerindeki toplam bakteri ve toplam *Bacillus cereus* sayıları

Örnek	Toplam Bakteri Sayısı cfu/ml	<i>Bacillus cereus</i> sayısı cfu/ml
3A	$1.4 \times 10^2$	-
3B	$6.4 \times 10$	1.6
3C	$1.1 \times 10^3$	2
3D	$5.8 \times 10$	1
3E	$7 \times 10$	8
3F	$6.2 \times 10$	-
3G	$8.6 \times 10$	0.5
3H	$9.4 \times 10$	8.5
3I	$9.8 \times 10$	1.4
3İ	$3.6 \times 10$	0.3
3K	$3 \times 10$	0.4
3L	$8.8 \times 10$	0.4
3M	$2.34 \times 10^3$	0.2
3N	$1.8 \times 10$	1
3O	$8.8 \times 10$	0.7
3P	$9.2 \times 10$	0.3
3R	$1.9 \times 10^2$	0.4
3S	$3.2 \times 10$	0.4
3T	$2 \times 10^2$	-
3U	$5 \times 10$	1.5
3V	$7.8 \times 10$	3
3Y	$4 \times 10^2$	0.8

Çizelge 3.5. Peynir örneklerindeki toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* sporu sayıları

Örnek	Toplam Bakteri Sayısı cfu/ml	Toplam Spor Sayısı cfu/ml	<i>Bacillus cereus</i> Vejetatif hücre Sayısı cfu/ml	<i>Bacillus cereus</i> Spor Sayısı cfu/ml
4A	1.95x10 <sup>6</sup>	2.5x10	-	-
4B	2.05x10 <sup>6</sup>	2.5x10	5	5
4C	2.5x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>2</sup>	-	-
4D	3.5x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>2</sup>	1	1
4E	2.25x10 <sup>4</sup>	5x10	2	2
4F	8x10 <sup>6</sup>	5x10	2	-
4G	2x10 <sup>7</sup>	1.5x10 <sup>2</sup>	1.5	-
4H	2.5x10 <sup>2</sup>	-	-	-
4I	1.4x10 <sup>7</sup>	7.5x10	9	-
4K	2.3x10 <sup>6</sup>	5x10	-	-
4L	1.15x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>2</sup>	-	-
4M	7.5x10 <sup>6</sup>	5x10	14	-
4N	5.5x10 <sup>4</sup>	-	-	-
4O	1x10 <sup>6</sup>	2.5x10	-	-
4P	3x10 <sup>5</sup>	2.5x10	-	-
4R	1.4x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>2</sup>	-	-
4S	2.25x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>2</sup>	19	-
4T	1.65x10 <sup>7</sup>	8.4x10	-	-
4U	1.65x10 <sup>4</sup>	2x10	-	-
4Ü	4x10 <sup>6</sup>	8x10	-	-
4V	3.5x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>2</sup>	18	-
4Y	5x10 <sup>6</sup>	6.4x10	-	-
4Z	1.2x10 <sup>7</sup>	3.2x10	-	-
4W	1.15x10 <sup>6</sup>	1.28x10 <sup>2</sup>	-	-

### 3.3. Elde Edilen İzolatlara Uygulanan İdentifikasyon Testleri

Dondurma, çiğ süt, pastörize süt ve peynir örneklerinin incelenmesi sonucunda toplam 82 izolat saf kültür halinde elde edilmiştir. Bu izolatların 11 tanesi dondurma örneklerinden, 28 tanesi çiğ süt örneklerinden, 28 tanesi pastörize süt örneklerinden ve 15 tanesi de peynir örneklerinden elde edilmiştir. Tüm izolatların hem nütrient agar içeren yatık agarlara hem de % 15' lik gliserole stok kültürleri hazırlanarak identifikasyon testlerinde kullanılmak üzere muhafazası sağlanmıştır.

Gram reaksiyonu, hücre morfolojisi, hemoliz, glukozdan asit ve gaz oluşturma, nitratı-nitrite indirgeme, Voges-Proskauer reaksiyonu, nütrient agarda üreme tipi ve katalaz gibi testler tüm izolatlara uygulanmıştır. Standart *Bacillus cereus*' un (NRRL B-3711) MYP agardaki görüntüsü Şekil 3.1.' de verilmiştir.

#### 3.3.1. Gram Boyama ve Hücre Morfolojisi

İzolatlar Gram boyası ile boyanıp mikroskopta incelendiğinde mor renkte çubuklar olarak gözlenmiştir. Tüm izolatlar Gram (+) basil olarak değerlendirilmiştir.

#### 3.3.2. Glukozdan Asit ve Gaz Oluşturma

82 izolatın tümü Durham tüpleri içeren glukoz broth besiyerini kırmızı renkten sarı renge dönüştürerek glukozdan asit üretmişlerdir. Durham tüplerinde ise hava kabarcığı gözlenmemiştir. Tüm izolatlar glukozdan asit oluşturmuş ancak gaz oluşturmamıştır. Pozitif ve negatif test sonuçları Şekil 3.2.' de verilmiştir.

#### 3.3.3. Katalaz Testi

Nütrient agarda geliştirilen izolatların kolonileri üzerine %3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi damlatılarak gaz çıkışı pozitif olarak değerlendirilmiştir. 82 izolatın tümü katalaz pozitif olarak kaydedilmiştir.

### 3.3.4. Hemoliz Testi

%5 steril kan içeren tryptose blood agar besiyerine izolatlardan ekim yapılmış, 30<sup>0</sup>C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında şeffaf bir zon oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Çalışmamızda elde edilen 82 izolatın 69 tanesinin hemoliz yaptığı, 13 tanesinin ise hemoliz yapmadığı belirlenmiştir.

### 3.3.5. Nitrat Redüksiyonu

Elde edilen izolatlar nitrat broth içeren tüplere inoküle edilmiş ve 30<sup>0</sup>C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültürler üzerine 250 µl sülfanilik asit çözeltisi ve 250 µl α-naftilamin solüsyonu damlatılarak besiyerinde kırmızı-kahverengi rengin oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. 82 izolatın 8 tanesinin nitratı-nitrite indirgeyemediği, 74 tanesinin ise pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Pozitif ve negatif test sonuçları Şekil 3.2.' de verilmiştir.

### 3.3.6. Voges Proskauer Reaksiyonu

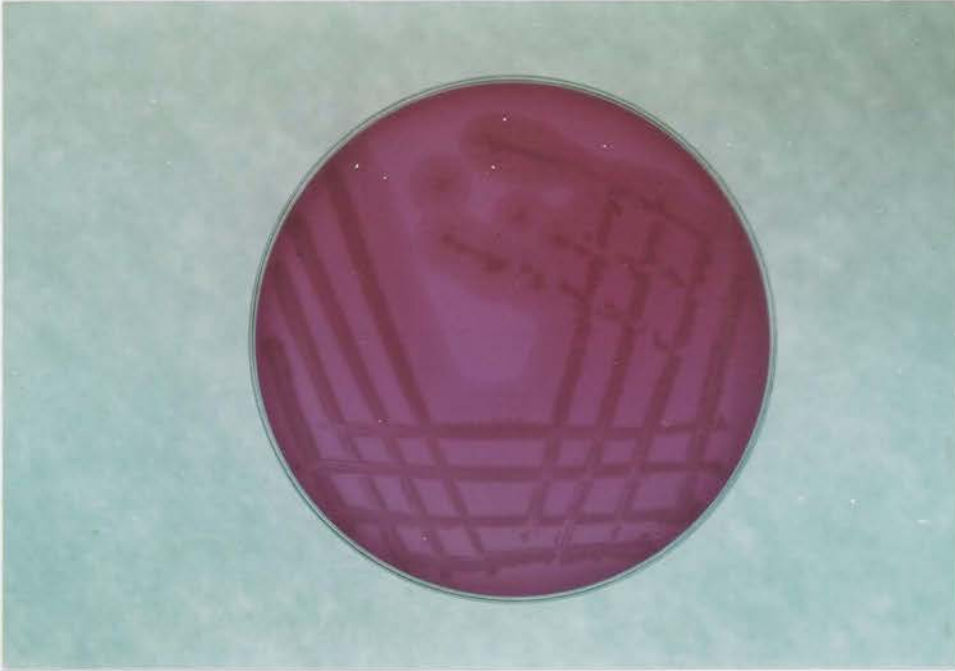
İzolatlar MR-VP broth (glukozlu fosfatlı buyyon) içeren tüplere ekilmiş ve 30<sup>0</sup>C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler üzerine α-naftol solüsyonu ve %40' lık KOH çözeltisi damlatılarak besiyerinde pembe renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. 4 izolatın Voges Proskauer reaksiyonu test sonuçları negatif, 78 tanesinin ise pozitif olarak belirlenmiştir. Pozitif ve negatif test sonuçları Şekil 3.2.' de verilmiştir.

### 3.3.7. Nütrient Agarda Üreme

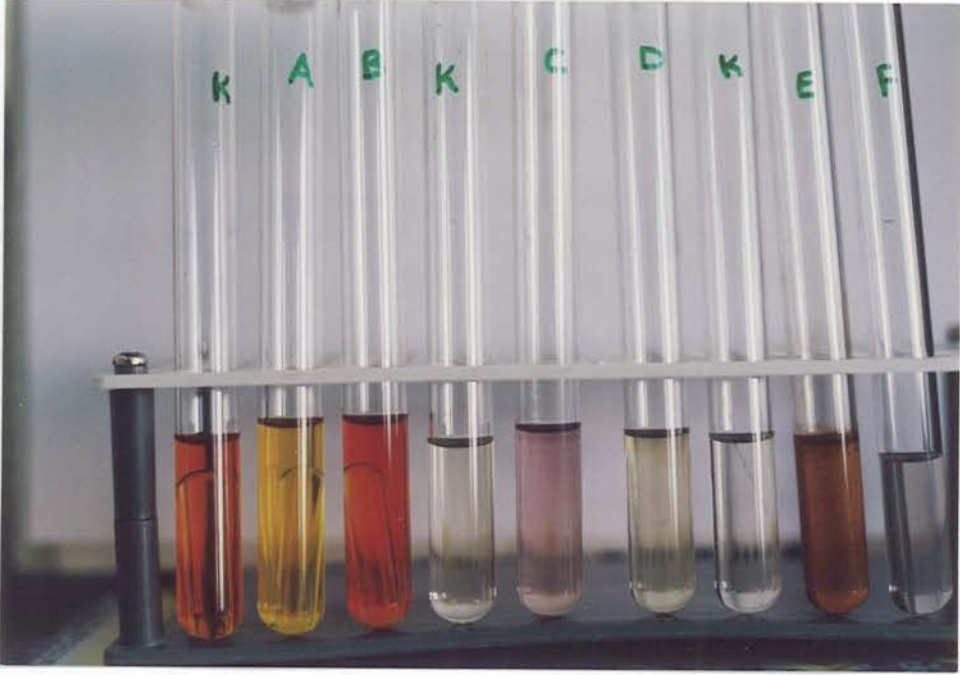
Nütrient agarda koloni tipi *Bacillus cereus* ile *Bacillus mycoides* arasındaki en önemli farktır. Pekçok karakter yönünden benzerlik gösteren bu iki bakteri türünden *Bacillus cereus* nütrient agarda dallanmamış koloniler

oluştururken, *Bacillus mycoides* ise dallanmış (rhizoidal) koloniler oluşturmaktadır [21,23,39]. 82 izolatın 12 tanesi nütrient agarda dallanmış tipli koloni oluştururken 70 tanesi normal üreme göstermiştir.

Sonuçta Gram (+) basil, glukozdan asit oluşturan fakat gaz oluşturmeyen, lesitinaz pozitif olan,  $\beta$ -hemoliz yapan, nitratı-nitrite indirgeyen, Voges-Proskauer reaksiyonu pozitif olan, katalaz pozitif olan izolatlar *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır. Yapılan identifikasyon testleri sonucunda; gıda örneklerinden elde edilmiş 82 izolatın 69 tanesi *Bacillus cereus* olarak tanımlanırken 13 tanesi tanımlanamamıştır. Uygulanan tüm identifikasyon testlerinin sonuçları Çizelge 3.6.' da verilmiştir.



Şekil 3.1. Standart *Bacillus cereus*' un (NRRL B-3711) MYP agarda görünümü



Şekil 3.2. Glukozdan asit ve gaz oluşumu, Voges Proskauer reaksiyonu, Nitrat Redüksiyonu test sonuçları

K – Kontrol

A – Glukozdan asit (+), gaz (-)

B – Glukozdan asit (-), gaz (-)

C – Voges Proskauer Reaksiyonu (+)

D – Voges Proskauer Reaksiyonu (-)

E – Nitrat Redüksiyonu (+)

F – Nitrat Redüksiyonu (-)

A,C,E – *Bacillus cereus* (NRRL B 3711)

B,D,F – *Bacillus sphaericus* (NRRL B 4897)

Çizelge 3.6. İdentifikasyon test sonuçları

İzolat	Gr Reaksiyonu ve Morfoloji	Glukozdan Asit	Glukozdan Gaz	$\beta$ Hemoliz	Nitrat Redüksiyonu	Voges Proskauer	Nütrient A' da Üreme	Katalaz	Muhtemel İdentifikasyon
<i>B. cereus</i> NRRL B 3711	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
1GSd	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
1FS	Gram (+) basil	+	-	+	+	-	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
1G	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
1YS	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
1Şa	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
1Y	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
1GSç	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
1Şb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
1GSa	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
1C	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
1GSb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2Vc	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2BS	Gram (+) basil	+	-	+	+	-	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2OSa	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2FSa	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>

Çizelge 3.6. (Devam) İdentifikasyon test sonuçları

İzolat	Gr Reksiyonu ve Morfoloji	Glukozdan Asit	Glukozdan Gaz	$\beta$ Hemoliz	Nitrat Redüksiyonu	Voges Proskauer	Nütrient A' da Üreme	Katalaz	Muhtemel İdentifikasyon
2Va	Gram (+) basil	+	-	+	-	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2ISa	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2PSa	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2PSb	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Dallanmış	+	(-)
2JSb	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
2TSA	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
2NSa	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
2LSb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2JSa	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
2Y	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2WS	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2Zb	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
2XS	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2NSb	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
2KSA	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2TSb	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
2FSb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>



Çizelge 3.6. (Devam) İdentifikasyon test sonuçları

İzolat	Gr Reaksiyonu ve Morfoloji	Glukozdan Asit	Glukozdan Gaz	$\beta$ Hemoliz	Nitrat Redüksiyonu	Voges Proskauer	Nütrient A' da Üreme	Katalaz	Muhtemel İdentifikasyon
2Za	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2OSb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2ISb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2LSa	Gram (+) basil	+	-	+	-	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2ZS	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2ES	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
2Vb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3N	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Eb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3U	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Va	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Y	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Vb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Ha	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3S	Gram (+) basil	+	-	+	-	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Ba	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3P	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>

Çizelge 3.6. (Devam) İdentifikasyon test sonuçları

İzolat	Gr Reksiyonu ve Morfoloji	Glukozdan Asit	Glukozdan Gaz	$\beta$ Hemoliz	Nitrat Redüksiyonu	Voges Proskauer	Nütrient A' da Üreme	Katalaz	Muhtemel İdentifikasyon
3Ib	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Da	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Db	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Cc	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Cb	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Ca	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3O	Gram(+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
3L	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3R	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Ea	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Bb	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Ec	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3K	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3M	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3Hb	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3G	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
3İ	Gram(+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>

Çizelge 3.6. (Devam) İdentifikasyon test sonuçları

İzolat	Gr Reaksiyonu ve Morfoloji	Glukozdan Asit	Glukozdan Gaz	$\beta$ Hemoliz	Nitrat Redüksiyonu	Voges Proskauer	Nütrient A' da Üreme	Katalaz	Muhtemel İdentifikasyon
3Ia	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4Ba	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	Normal	+	(-)
4Ib	Gram (+) basil	+	-	-	-	+	Normal	+	(-)
4Bb	Gram (+) basil	+	-	-	+	-	Normal	+	(-)
4Sa	Gram (+) basil	+	-	+	-	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4Vb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Dallanmış	+	<i>Bacillus cereus</i>
4Va	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4E	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4Sb	Gram (+) basil	+	-	+	-	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4Vc	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4F	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4Ma	Gram (+) basil	+	-	+	+	-	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4Mb	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4G	Gram (+) basil	+	-	+	-	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>
4Ia	Gram (+) basil	+	-	-	-	+	Dallanmış	+	(-)
4D	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	Normal	+	<i>Bacillus cereus</i>

+ pozitif sonuç

- negatif sonucu

(-) ise identifiye edilememiş izolatları göstermektedir

### 3.4. Total Hücre Proteinlerinin Elde Edilmesi ve SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

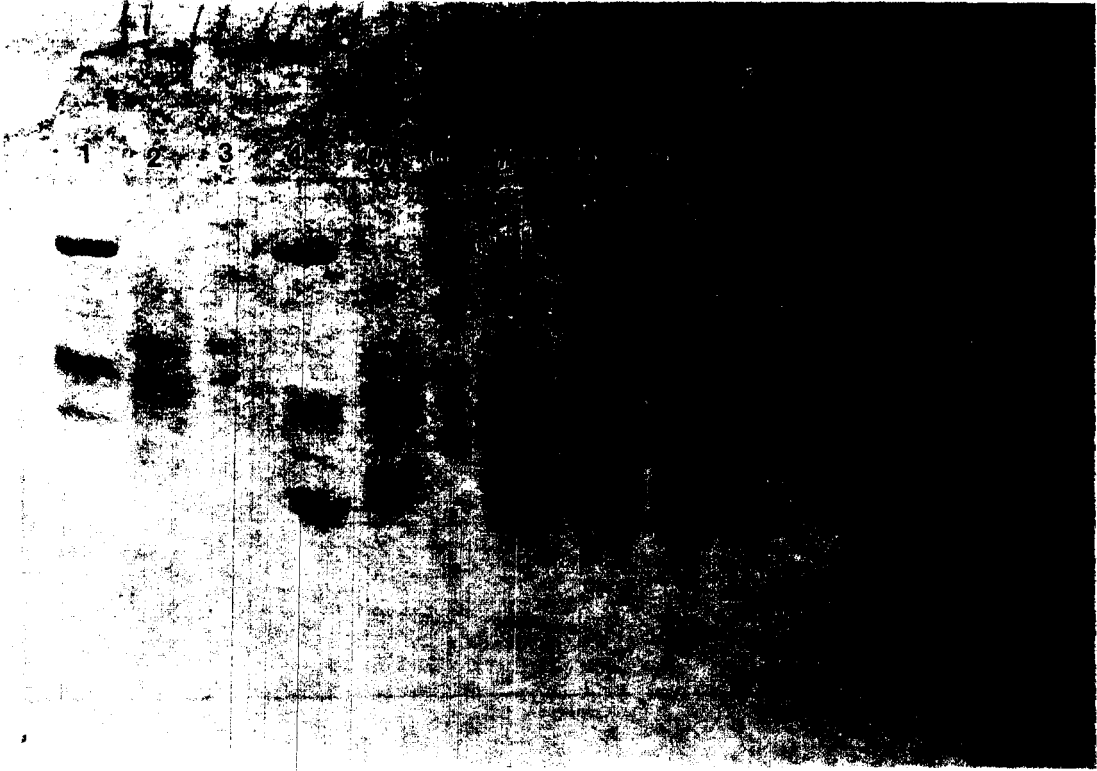
*Bacillus cereus* olarak değerlendirilen izolatlardan 1G (dondurma) ve 3N (pastörize süt) ile standart *Bacillus cereus* (NRRL B-3711) total hücre proteinlerinin eldesi için en uygun yöntemi belirlemek üzere 3 ayrı yöntemle tabi tutulmuşlardır. En yüksek protein konsantrasyonu (en yüksek absorbans - 595 nm) sonikatörle muamele edilen örneklerde saptanmıştır. Her 3 yöntemle hazırlanan *Bacillus cereus* protein ekstraları SDS poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutularak protein bantlarının ayrılması sağlanmıştır. Total hücre proteinlerinin elde edilmesinde kullanılan 3 yöntemle ait absorbans sonuçları Çizelge 3.7.' de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Total hücre proteini elde etmek için kullanılan 3 yöntemle ait absorbans sonuçları

Bakteri	1. yöntem	2. yöntem	3. yöntem
<i>Bacillus cereus</i> (NRRL B 3711)	0.235	0.255	1.017
1G	0.241	0.250	0.899
3N	0.382	0.276	0.750

Matar ve ark. [45] ve Klement ve ark. [49]' nın yöntemine göre hazırlanan protein örneklerinde protein konsantrasyonları çok düşük bulunmuştur (Çizelge 3.7;1. ve 2. Yönteme ait absorbans sonuçları). Ayrıca hazırlanan protein ekstralarının bant ayrımları gözlenememiştir (Şekil 3.3; 1,2,3,4,5 ve7 no' lu çukurlar).

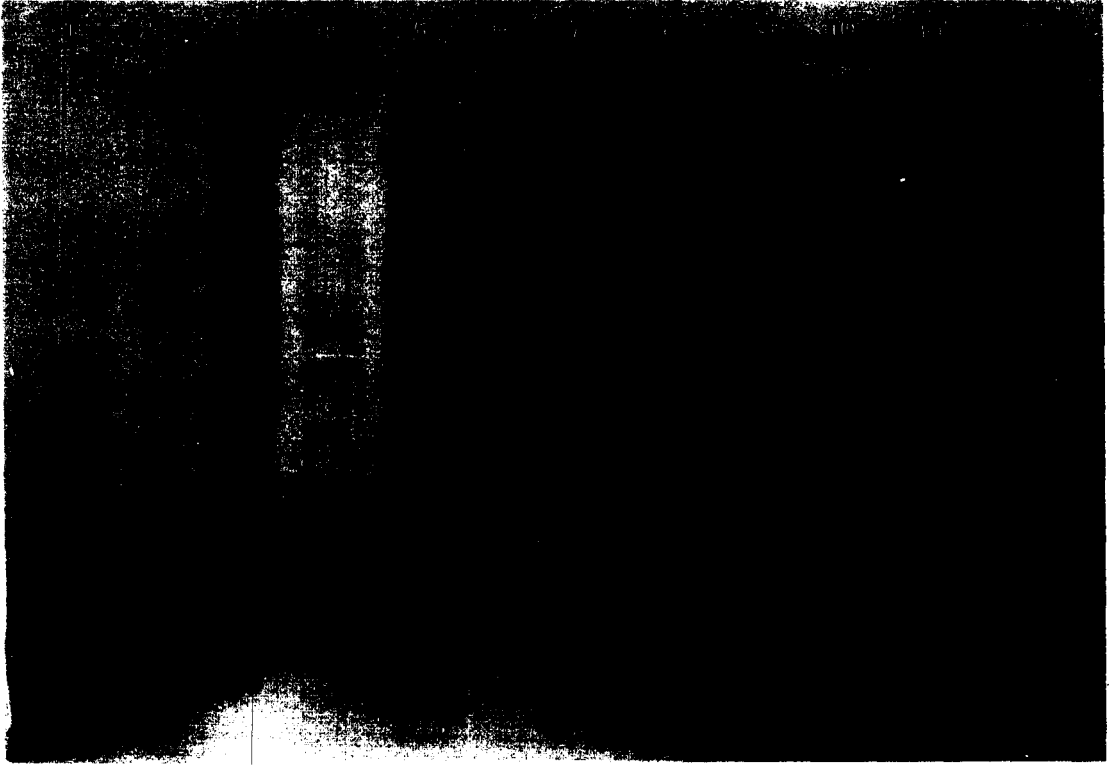
Viola ve ark. [44]' nın yöntemiyle Tris citrate tamponu içinde 3sn-3sn periyotlarda buz üzerinde 5-6 dakika sonikasyona tabi tutularak hazırlanan protein örneklerinde hem protein konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.7; 3. yöntemle ait absorbans sonuçları) hem de diğer yöntemlere göre daha iyi bir bant ayrımı gözlenmiştir (Şekil 3.3; 8,9 ve 10 no'lu çukurlar). Bu nedenle çalışmamızda izole edilen diğer *Bacillus cereus* izolatlarının protein ekstralarının hazırlanmasında bu yöntem (sonikasyonla muamele) tercih edilmiştir.



Şekil 3.3. Total hücre proteinlerinin elde edilmesinde kullanılan 3 yöntemle ait protein bantları  
 1-2-3 no' lu çukurlar 1. yöntem  
 4-5-7 no' lu çukurlar 2. yöntem  
 8-9-10 no' lu çukurlar 3. yöntemle elde edilmiş protein ekstratlarını içermektedir.  
 1-4-8-no' lu çukurlar *Bacillus cereus* NRRL B-3711  
 2-5-9 no' lu çukurlar 1G izolatu  
 3-7-10 no' lu çukurlar 3N izolatu a ait protein ekstratlarını içermektedir.

3. yöntem (sonikasyon) kullanılarak standart *Bacillus cereus* (NRRL B 3711) ve bizim çalışmamızdan elde edilen 10 izolatu (1G, 1Y, 2Ksa, 2Y, 2FSb, 3N, 3Y, 3Cb, 4F, 4E) protein örnekleri hazırlanarak SDS-Poliakrilamid Jel Elektroförezinde protein profilleri elde edilmek üzere elektroföze tabi tutulmuştur. 2' si dondurma örneklerinden, 3 tanesi çiğ süt örneklerinden, 3 tanesi pastörize süt örneklerinden ve 2' si de peynir örneklerinden elde edilmiş 10 izolatu tümünün SDS-PAGE' de band ayrımı oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 3.4; 1-5 ve 7-12 no' lu çukurlar). 6 no' lu çukurda yer alan geniş aralıklı protein işaretleycisi (Sigma M 4038) üretici firmanın taahhüt ettiği 13 farklı molekül ağırlığındaki (sırasıyla 205.000, 116.000, 97.000, 84.000, 66.000, 55.000, 45.000, 36.000, 29.000, 24.000, 20.000, 14.200 ve 6.500 Da) bandları oluşturmamıştır. Bizim tespitlerimize göre jel üzerinde tahminen 9 band belirlemiştir (Şekil 3.4; 6

no' lu çukur). Bu bandların hangisinin hangi molekül ağırlığına karşılık geldiği tespit edilememiştir. Bu nedenle de örneklere ait protein bandlarının molekül ağırlığının tesbiti yapılamamıştır. Birinci çukurda bulunan *Bacillus cereus* NRRL B 3711, 2. çukurda bulunan 1G, 4. çukurda bulunan 2KSa, 5. çukurda bulunan 2Y izolatu ile, 10, 11 ve 12. çukurlarda bulunan 3Cb, 4F ve 4E izolatlarına oranla; 3. çukurda yürütülen 1Y, 7. çukurda yürütülen 2FSb, 8. çukurda yürütülen 3N ve 9. çukurda yürütülen 3Y izolatları daha koyu protein bantları oluşturmuşlardır. Standart *Bacillus cereus* NRRL B 3711 (1 no' lu çukur) ile bizim çalışmamızda identifiye ettiğimiz 10 *Bacillus cereus* suşu genel olarak birbirine benzer protein band profilleri oluşturmuşlardır (Şekil 3.4.)



Şekil 3.4. *Bacillus cereus* izolatlarının total hücre proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile incelenmesi

1. çukur *Bacillus cereus* NRRL B 3711, 2. çukur 1G (dondurma), 3. çukur 1Y (dondurma), 4. çukur 2K.Sa (çiğ süt), 5. çukur 2Y (çiğ süt), 6. çukur işaretleyici protein (Sigma M 4038), 7. çukur 2FSb (çiğ süt), 8. çukur 3N (pastörize süt), 9. çukur 3Y (pastörize süt), 10. çukur 3Cb (pastörize süt), 11. çukur 4F (peynir), 12. çukur 4E (peynir)

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Bacillus cereus* gıda zehirlenmelerine neden olan patojen bir mikroorganizmadır. Süt ve süt ürünleri, pirinç, nişasta, baharat, kuru gıdalar ve et ürünlerinden sıklıkla izole edilebileceği bildirilmiştir. *Bacillus cereus* süt ve süt mamüllerinde çok yaygın olup çiğ sütlerde her zaman bulunmaktadır. Pastörizasyon sonrasında ise sporlarının canlı kalabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle de süt kalitesini etkileyen en önemli mikroorganizmalardan birisinin de *Bacillus cereus* olduğu bildirilmiştir. Bir yandan fermentatif etkisiyle gıda maddelerinde kokuşmaya varan bozulmalara neden olurken diğer yandan ısıya dirençli sporlarıyla gıda hijyeni yönünden ayrı bir önem taşımaktadır. *Bacillus cereus* oluşturduğu 2 farklı toksin nedeniyle de diyarejenik ve emetik tip olmak üzere 2 farklı tip gıda zehirlenmesi oluşturmaktadır [1,7].

Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarında, etkenlerin önemini belirlemede istatistiklere bakılırsa; *Staphylococcus aureus* intoksikasyonları ve *Salmonella* enfeksiyonları ön sıralarda yer almaktadır. Yurdumuzda ise gıda zehirlenmelerinin en sık patojenleri olarak *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Bacillus cereus* bildirilmiştir [4,5]. Çeşitli dünya ülkelerinde artan önemine paralel olarak pek çok gıda maddesi *Bacillus cereus* varlığı yönünden incelenmektedir. Ancak ülkemizde *Bacillus cereus* ile ilgili yapılmış çalışma sayısı oldukça azdır [7]. Bizim çalışmamız bu boşluğu kısmen doldurmayı hedeflemiş ve Eskişehir’ de tüketilen süt ve süt ürünlerinde *Bacillus cereus* varlığı araştırılmıştır.

Son yıllarda *Bacillus cereus*’ un izolasyonunda en sık kullanılan besiyerleri MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin B Agar), PEMBA (Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar) ve Tryptose Blood Agar olarak belirlenmiştir. MYP ve PEMBA’ nın *Bacillus cereus* izolasyonunda kullanılması aynı temele dayanmaktadır. Besiyerine eklenen polymyxin antibiyotiği ile Gram (-) mikroorganizmaların üremesi inhibe edilmekte, mannitol negatif, lesitinaz pozitif bakteri kolonileri ise *Bacillus cereus* olarak değerlendirilmektedir. Tryptose Blood Agar üzerinde hemoliz oluşturan koloniler *Bacillus cereus* olarak değerlendirilerek identifikasyon testlerine alınmaktadır. Yapılan çalışmalar *Bacillus cereus* izolasyonu için MYP ve PEMBA’ nın benzer

sonuçlar verdiğini, Tryptose Blood Agar' ın ise bu 2 besiyerine oranla daha az selektif olduğunu göstermiştir [10,52].

MYP ve PEMBA *Bacillus cereus* sayımında benzer sonuçlar vermesine rağmen, PEMBA besiyerinde mannitol negatif bakteri kolonileri çok rahat belirlenemediği için identifikasyon testi olarak mannitol kullanımının yeniden test edilmesi gerekliliği bir dezavantaj olarak bildirilmiştir [52]. Ayrıca MYP besiyerinin hazırlanışında kullanılan malzeme sayısı PEMBA' ya oranla daha azdır. Dolayısıyla MYP agar PEMBA' ya oranla hem daha ekonomiktir hem de hazırlanışı daha kolaydır. Bu nedenle bizim çalışmamızda *Bacillus cereus* izolasyonu için MYP agar kullanılmıştır.

Eskişehir piyasasında tüketime sunulan dondurma, çiğ süt, pastörize süt ve peynir örneklerinin toplam bakteri, toplam spor, *Bacillus cereus* vejetatif hücre ve *Bacillus cereus* spor sayımlarının yapıldığı çalışmamızda 25 adet dondurma, 27 adet çiğ süt, 22 adet pastörize süt ve 24 adet peynir örneği incelemeye tabi tutulmuştur.

Dondurma örneklerinin incelenmesi sonucunda örneklerin çok büyük bir kısmının toplam bakteri sayıları yönünden gıda tüzüğüne uymadığı belirlenmiştir. 25 dondurma örneğinin 20 tanesinde gıda tüzüğüne verilen maksimum  $10^5$  cfu/ml üzerinde toplam bakteri sayımı elde edilmiştir. Dondurma örneklerinin 7 tanesinde (% 28) *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayımı yapılırken, 5 örnekte de (% 20) *Bacillus cereus* sporları belirlenmiştir. 25 dondurma örneğinin 8 tanesinde (% 32) *Bacillus cereus* varlığı belirlenmiştir. Ancak elde edilen *Bacillus cereus* sayımları oldukça düşük bulunmuştur. Dondurma örneklerindeki en yüksek *Bacillus cereus* sayımı  $3 \times 10^3$  cfu/ml ile 1C örneğinden elde edilirken, en düşük sayım 5 cfu/ml ile 1Y örneğinden elde edilmiştir (Çizelge 3.2.)

İncelenen çiğ süt örneklerinin tümünde çok yüksek sayılarda toplam bakteri sayımı elde edilmiştir. Toplam bakteri sayısı  $2 \times 10^8$  cfu/ml 'ye kadar çıkabilmektedir. Çiğ süt örneklerinde toplam bakteri yükünün bu kadar yüksek olmasının nedeni sütün mikroorganizmaların gelişmesi için ideal bir besi ortamı olmasından kaynaklanmaktadır. Çiğ sütte temel florayı *Micrococcus* türleri ve *Streptococcus* türleri oluşturmaktadır. Ancak mikrobiyal kontaminasyonlar ile *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* türleri de çiğ sütte



bulunabilir [4]. 27 adet çiğ süt örneğinin 3 tanesinde (% 11.1) *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayımı, 15 tanesinde (% 55.5) *Bacillus cereus* sporlarının sayımı yapılmıştır. Ortalama olarak 27 çiğ süt örneğinin 16 tanesinden (% 59) *Bacillus cereus* sayımı elde edilmiştir. Gıda örneklerinin büyük bir yüzdesinde *Bacillus cereus* varlığı gözlemesine rağmen mikroorganizma sayısı çok düşük olarak belirlenmiştir. En yüksek *Bacillus cereus* sayımı  $3 \times 10^1$  cfu/ml ile 2P örneğinden elde edilmiş, en düşük sayım ise 15 cfu/10ml ile 2Y örneğinde gözlenmiştir (Çizelge 3.3.).

22 pastörize süt örneğinin incelendiği çalışmamızda pastörize sütün daha önce bir ısısal işlemde geçirildiği bilindiği için süt örnekleri tekrar  $80^{\circ}\text{C}$ ' de 15 dakikalık ısı muamelesine tabi tutulmamıştır. Bu nedenle sadece toplam bakteri ve *Bacillus cereus* sayımı yapılmıştır. İncelenen pastörize süt örneklerinde maksimum toplam bakteri sayımı  $2.34 \times 10^3$  cfu/ml ile 3M örneğinden elde edilmiştir. Ancak hiçbir pastörize süt örneğinde gıda tüzüğüne belirlediği maksimum  $4 \times 10^4$  cfu/ml olan toplam bakteri sayımının üzerinde değerler belirlenmemiştir. *Bacillus cereus* sayımı ise 22 pastörize süt örneğinin 19 tanesinde (% 86.4) yapılmış olmasına rağmen maksimum sayım 3H örneğinde 8.5 cfu/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4.).

İncelenen 24 peynir örneğinin 9 tanesinde (% 37.5) *Bacillus cereus*, 3 tanesinde (% 12.5) *Bacillus cereus* spor sayımı yapılmıştır. Ortalama olarak 24 peynir örneğinin % 37.5' i *Bacillus cereus* ile kontamine olarak kaydedilmiştir. Oran yüksek olmasına rağmen maksimum *Bacillus cereus* sayısı 19 cfu/ml gibi oldukça düşük sayılarda 4S örneğinden elde edilmiştir (Çizelge 3.5.).

Wong ve ark. [7] yaptıkları çalışmada inceledikleri dondurma örneklerinin % 52' sini, pastörize sütlerin % 35' ini *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bildirmişlerdir. Netten ve ark. [7] ise inceledikleri pastörize süt örneklerinin % 8.4' ünü, peynir örneklerininse % 2' sini *Bacillus cereus* ile kontamine olarak kaydetmişlerdir. Yaptığımız çalışma sonuçları incelendiğinde ise Eskişehir piyasasında tüketime sunulmuş olan dondurma örneklerinin % 32' si, pastörize süt örneklerinin % 86.4' ü, peynir örneklerinin ise % 37.5' i *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bulunmuştur.

Rangasamy ve ark. [18] tarafından yapılan çalışmada çiğ süt örneklerinin ortalama % 21' i, pastörize süt örneklerinin % 25' i, peynir örneklerinin % 30' u, dondurma örneklerinin ise % 40' ı *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bulunmuştur. Gıda örneklerindeki *Bacillus cereus* sayısının ise  $5 \times 10^2$  cfu/gr-ml' yi aşmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise çiğ süt örneklerinde % 59 oranında, dondurma örneklerinde % 32, pastörize süt örneklerinde % 86.4, peynir örneklerinde ise % 37.5 oranında *Bacillus cereus* varlığı saptanmıştır. İncelenen tüm gıda örnekleri değerlendirildiğinde çalışmamızda en yüksek *Bacillus cereus* sayımı  $3 \times 10^3$  cfu/ml ile 1C (dondurma) örneğinden elde edilmiştir. Genel olarak gıda örneklerinde yüksek oranda *Bacillus cereus* varlığı gözlenmesine karşın sayıları düşük olarak belirlenmiştir. Wong ve ark. [19]' nın yaptığı çalışmada ise fermente sütte % 17 oranında, dondurmada % 52 oranında *Bacillus cereus* varlığı belirlenmiştir. İncelenen süt ürünü örneklerindeki ortalama *Bacillus cereus* sayısı 15-280 cfu/ml-gr olarak belirlenmiştir.

Ahmed ve ark. [20] tarafından yapılan çalışmada incelenen çiğ süt örneklerinin % 9' u, pastörize süt örneklerinin % 35' i, peynir örneklerinin % 14' ü, dondurma örneklerinin % 48' i *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bildirilmiştir. İncelenen dondurma örneklerinde *Bacillus cereus* sayısının  $3.8 \times 10^3$  cfu/gr' ı, çiğ süt örneklerinde  $1 \times 10^2$  cfu/ml' yi, pastörize süt örneklerinde  $1 \times 10^3$  cfu/ml' yii peynir örneklerinde ise  $2 \times 10^2$  cfu/gr' ı aşmadığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada ise dondurma örneklerindeki maksimum *Bacillus cereus* sayısı  $3 \times 10^3$  cfu/ml, çiğ süt örneklerinde  $3 \times 10^1$  cfu/ml, pastörize süt örneklerinde 8.5 cfu/ml, peynir örneklerinde ise maksimum  $2 \times 10^1$  cfu/ml olarak kaydedilmiştir. Giffel ve ark. [21] yaptıkları çalışmada inceledikleri çiğ süt örneklerinin % 35' ini *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bildirmişlerdir. Larsen ve ark. [29] ise inceledikleri pastörize süt örneklerinin % 56' sını, çiğ süt örneklerinin ise % 25' ini *Bacillus cereus* ile kontamine olarak belirtmişlerdir. İncelenen örneklerdeki *Bacillus cereus* sayısı ise  $10^3$ - $3 \times 10^5$  cfu/ml olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise çiğ süt örneklerindeki *Bacillus cereus* sayısı maksimum  $3 \times 10^1$  cfu/ml olarak bulunmuş, pastörize süt örneklerinde bu sayı iyice azalmış ve maksimum 8.5 cfu/ml olarak belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda incelenen tüm süt ve süt ürünlerindeki *Bacillus cereus* sayıları değerlendirildiğinde elde edilmiş olan *Bacillus cereus* sayım verilerinin gıda zehirlenmesi oluşturacak düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Ancak diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında *Bacillus cereus* sayıları düşük olsa bile *Bacillus cereus* varlığının yüksek oranlarda olduğu gözlenmektedir. *Bacillus cereus*' un gıda zehirlenmesine yolaçabilmesi için gıda örneklerinde  $10^5$ - $10^6$  cfu/ml yada daha üzerinde konsantrasyonlarda bulunması gerektiği bildirilmiştir. Gıda örneklerindeki *Bacillus cereus* sayıları düşük bulunmuş olsa da *Bacillus cereus*' un bir gıda patojeni olduğunun unutulmaması gerekmektedir.

*Bacillus cereus* izolatlarının identifikasyonu için çeşitli identifikasyon testleri uygulanabilmektedir. Shinagawa [11] yaptığı çalışmada *Bacillus cereus*' un identifikasyonu için sıklıkla kullanılan identifikasyon testlerini gram boyama, hareketlilik testi, Voges-Proskauer reaksiyonu, hemoliz, sitratı kullanma, nitrat redüksiyonu ve glukozdan asit-gaz oluşturma olarak belirlemiştir. Giffel ve ark. [21,23] ise *Bacillus cereus*' un identifikasyonu için çeşitli kaynaklardan elde ettikleri izolatlara hemoliz, nitrat redüksiyonu ve voges-proskauer gibi temel identifikasyon testlerini uygulayarak her 3 testin de pozitif sonuç verdiği izolatları *Bacillus cereus* olarak tanıfıye etmişlerdir. Temel identifikasyon testleri dışında serotiplendirme, faj tiplendirmesi ve toksin üretiminin incelenmesi testlerinde uygulanabileceği belirtilmektedir [11].

Bu çalışmada dondurma, çiğ süt, pastörize süt ve peynir örneklerinden MYP seçici besi ortamına yapılan ekimler sonunda gelişen krem renkli, presipitasyon halkası oluşturmuş ve etrafını pembeye boyamış görünümdeki koloniler *Bacillus cereus* olarak tanımlanmış ve saf kültür halinde elde edilen 82 izolat temel identifikasyon testlerine tabi tutulmuştur. Bu testler sonunda kanlı agarda hemoliz oluşturmayan 13 izolat dışındaki 69 izolat *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda izole edilen *Bacillus cereus* strainlerinin toksin üretme yetenekleri araştırılmamıştır. Ancak özellikle pastörize süttten izole edilen *Bacillus cereus* strainlerinin önemli miktarda diareye neden olan enterotoksin üretme yeteneğinde olduğu da [29] unutulmamalıdır.

ISO prosedürüne göre *Bacillus cereus*' un glukoz fermentasyonu, Voges-Proskauer reaksiyonu ve nitrat redüksiyonu testlerinin tümünde pozitif sonuç vermesi gerekir. Ancak API 50 testlerinde % 5.4 oranında Voges Proskauer negatif ve % 3.5 oranında nitratı nitrite indirgemeyen *Bacillus cereus* strainlerinin varlığı saptanmıştır ve bu değerler hata sınırları içinde kabul edilmektedir [23]. Logan ve ark. ise [40] bu testlere cevap yönünden daha yüksek değerlerde (% 42 Voges Proskauer negatif ve % 13 nitratı nitrite indirgemeyen strainler) heterojenite gözlemiştir. Bizim çalışmamızda nitratı nitrite indirgemeyen 6 izolatın (% 8.7), Voges-Proskauer reaksiyonu negatif olan 3 izolatın (% 4.3) varlığı yukarıdaki bulgularla paraleldir ve bu da izolatların *Bacillus cereus* olarak identifikasyonunu etkilememektedir.

*Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus anthracis* ve *Bacillus thuringiensis*' in Gram reaksiyonu ve hücre morfolojisi, nitrat redüksiyonu, Voges-Proskauer reaksiyonu ve katalaz gibi temel testlere benzer cevap verdiği; MYP ve PEMBA agar besiyerinde de aynı tip koloniler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu nedenle de 4 bakteri türünün ayrımı için farklı testlerin uygulanması yoluna gidilmiştir. Kanlı agarda hemoliz oluşturma ve bunun kuvveti ayırdedici bir yöntem olarak belirlenmiştir. *Bacillus anthracis* kanlı agarda hemoliz yapmaz iken, *Bacillus cereus* kuvvetli hemolitik, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus thuringiensis* ise zayıf hemolitik olarak belirlenmiştir. Nutrient agar üzerinde rhizoidal (dallanmış) koloniler oluşturma ise *Bacillus mycoides*' e has bir özellik olarak verilmiştir. Faz kontrast mikroskobu yardımıyla endotoksin kristalleri varlığının saptanmasının ise *Bacillus thuringiensis*' in ayırtılmasında kullanıldığı bildirilmiştir [15,39]. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları da bu 4 bakteri türünün yüksek genetik homolojiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar bu bakteri türlerinin birbirinin alt türü olabileceği fikrini ortaya atmıştır [34]. Çalışmamızda saptadığımız, kanlı agarda hemoliz oluşturmayan 13 izolatın bu testlere göre *Bacillus anthracis* olma olasılığı yüksektir. İnsan ve hayvanlarda anthrax hastalığı etmeni olan bu bakteri ve özellikle dirençli sporları ciddi bir enfeksiyon yaratmaktadır [15]. Bunun dışında kalan 69 izolat ise temel identifikasyon testleri ile *Bacillus cereus* olarak tanımlanmış ve alt grup

identifikasyonları yapılmamıştır. Ancak, nütrient agarda dallanmış (rhizoidal) koloni oluşturan izolatların *Bacillus mycoides* [40] olma ihtimalleri vardır. İleriki çalışmalarda endotoksin kristallerinin varlığı da araştırılarak daha aydınlatıcı bilgiler elde edilebilir.

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte geleneksel taksonomik yöntemlerin sınırlı olduğu farkedilmiş ve moleküler identifikasyon-tiplendirme yöntemleri önem kazanmıştır. Moleküler identifikasyon ve tiplendirme yöntemlerinin en sık kullanılanlarını ise nükleik asit hibridizasyonu, sekans analizleri ve protein profillerinin elde edilmesi oluşturmaktadır. *Bacillus cereus* strainlerinin total hücre proteinlerinin çeşitliliği Matar ve ark. [45]' nin çalışması dışında araştırılmamıştır. Çalışmamızda temel identifikasyon testlerini takiben *Bacillus cereus* olarak belirlenen izolatlar modern tiplendirme yöntemlerinden biri olan protein profillerinin analizi ile de incelenmiştir.

Protein profillerinin incelenmesi öncelikle mikrobiyal proteinin eldesini içermektedir. *Bacillus cereus*' un total hücre proteinlerinin incelenmesi konusundaki tek çalışmada [45] uygulanan protein ekstresi hazırlama yöntemi, bizim çalışmamızda iyi bir band profili oluşturmamıştır. Buna karşın sonikasyonla elde edilen protein ekstratlarından daha iyi band profilleri elde edilmiştir.

Çalışmamızda geniş aralıklı protein ağırlık işaretleyicisi olarak kullanılan Sigma M 4038, SDS-PAGE' de beklenen 13 bandı oluşturmamıştır. Bunun nereden kaynaklandığı bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda belirli molekül ağırlıkta spesifik bir protein aranmadığı için, bu olumsuzluk çalışmanın amacını etkilememiştir. Ancak, temel bandların hangi moleküler ağırlıklar (kDa) arasında yer aldığı belirlenmesi açısından gereklidir.

Matar ve ark. [45] pirinç, klinik örnekler, süt tozu, toprak ve tozdan izole ettikleri 58 *Bacillus cereus* izolatının total hücre proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi sonunda 22 farklı protein profiline yerleştiklerini saptamışlardır. 22 farklı protein profilinde, elde edilen protein bantlarının molekül ağırlıkları 29-205 kDa arasında bulunmuştur. Ancak izolatların kaynağı ile protein profilleri arasında önemli bir ilişki gözleyememişlerdir. Bizim çalışmamızda da protein ağırlık

işaretleyicisinin molekül ağırlıkları arasında (6.5-205 kDa) protein bantları belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda SDS-PAGE tekniği ile *Bacillus cereus* strainlerinin total hücre protein profillerinin analizi yöntem geliştirme aşamasında kalmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda özellikle jele yüklenen protein konsantrasyonlarının eşitlenmesine ve farklı bir protein işaretleyicisi kullanılmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, SDS-PAGE jel analizi densitometre ile yapıldığında [49] daha iyi sonuçlar alınabilir.

Sonuç olarak Eskişehir çevresinde tüketime sunulmuş 98 adet süt ve süt ürünü örneğinin incelendiği bu çalışmanın devamında, diğer gıda örneklerinin (pirinç, kuru bakliyat, tahıl, baharat, et ürünleri) *Bacillus cereus* kontaminasyonu araştırılabilir ve izole edilen *Bacillus cereus* strainleri klinik izolatlar da dahil edilerek bu tezde geliştirilen SDS-PAGE ile total hücre proteinleri analizine tabi tutulabilir.

## KAYNAKLAR

1. ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ, F., *Gıda Mikrobiyolojisi*, 1998.
2. ÖNER, M., *Genel Mikrobiyoloji*, İzmir, 1992.
3. KARAPINAR, M., *Gıdaların Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü*, Ege Üniversitesi Basımevi, 1990.
4. TÜBİTAK-MAM., *Gıda Sanayiinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları*, Gebze-Kocaeli, 1995.
5. TOPAL, Ş., *Gıda Güvenliği ve Kalite Yönetim Sistemleri*, Gebze-Kocaeli, 1996.
6. SNYDER, P.O., MATTHEWS, M.E., *Microbiological Quality of Foodservice Menu Items Produced and Stored by Cook/Chill, Cook/Freeze, Cook/Hot-Hold and Heat/Serve Methods*, Journal of Food Protection, Vol.47, No.11, p.876-885, 1984.
7. AKSU, H., ERGÜN, Ö., *Gıda Maddelerinde Bacillus cereus' un Varlığı*, Kükem Dergisi, Cilt.19, Sayı.2, s.41-47, 1996.
8. GRANUM, P.E., BRYNESTAD, S., O'SULLIVAN, K., NISSEN, H., *Enterotoxin from Bacillus cereus: Production and Biochemical Characterization*, Bulletin of the IDF, Vol.287, p.38-41, 1993.
9. GILBERT, R.J., JENNIFER, P.M., *Serotypes of Bacillus cereus from Outbreaks of Food Poisoning and from Routine Foods*, J. Hyg., Vol.78, p.69-74, 1977.
10. BLACKIE, A&P., *Bacillus cereus*, Microorganisms in Foods; Microbiological Specifications of Food Pathogens, p.20-35, 1996
11. SHINAGAWA, K., *Analytical Methods for Bacillus cereus and Other Bacillus Species*, International Journal of Food Microbiology, Vol.10, p.125-142, 1990.
12. KIM, H.U., GOEPFERT, J.M., *Enumeration and Identification of Bacillus cereus in Foods*, Applied Microbiology, Vol.22, p.581-587, 1971.

13. TAYLOR, A.J., GILBERT, R.J., *Bacillus cereus Food Poisoning; A Provisional Serotyping Scheme*, J. Med. Microbiol., Vol.8, p.543-550, 1975.
14. THOMPSON, N.E., KETTERHAGEN, M.J., BERGDOLL, M.S., SCHANTZ, E.J., *Isolation and Some Properties of an Enterotoxin Produced by Bacillus cereus*, Infection and Immunity, Vol.43, p.887-894, 1984.
15. BALOWS, A., TRUPER, H.G., DWORKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K.H., FARRAR, W.E., REBOLI, A.A., *The Genus Bacillus-Medical*, The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application, p.1746-1768, 1992.
16. SCHIEMANN, D.A., *Occurrence of Bacillus cereus and the Bacteriological Quality of Chinese Take Out Foods*, Journal of Food Protection, Vol.41, p.450-454, 1978.
17. BLAKEY, L.J., PRIEST, F.G., *The Occurrence of Bacillus cereus in Some Dried Foods Including Pulses and Cereals*, Journal of Applied Bacteriology, Vol.48, p.297-302, 1980.
18. RANGASAMY, P.N., IYER, M., ROGINSKI, H., *Isolation and Characterization of Bacillus cereus in Milk and Dairy Products Manufactured in Victoria*, The Australian Journal of Dairy Technology, Vol.48, p.93-97, 1993.
19. WONG, H.C., CHANG, M.H., FAN, J.Y., *Incidence and Characterization of Bacillus cereus Isolates Contaminating Dairy Products*, Applied and Environmental Microbiology, Vol.54, p. 699-702, 1988.
20. AHMED, A.A.H., MOUSTAFA, M.K., MARTH, E.H., *Incidence of Bacillus cereus in Milk and Some Milk Products*, Journal of Food Protection, Vol.46, p.126-128, 1983.
21. GIFFEL, M.C., BEUMER, R.R., BONESTROE, M.H., ROMBOUITS, F.M., *Incidence and Characterization of Bacillus cereus in Two Dairy Processing Plants*, Netherlands Milk & Dairy Journal, Vol.50, p.479-492, 1996.
22. SHINAGAWA, K., KONUMA, H., TOKUMARU, M., TAKEMASA, N., HASHIGIWA, M., SHIGEHISA, T., LOPES, A.M., *Enumeration of Aerobic Spore Formers and Bacillus cereus in Meat Product Additives*, Journal of Food Protection, Vol.51, p.648-650, 1988.



23. GIFFEL, M.C., BEUMER, R.R., BONESTROE, M.H., ROMBOUITS, F.M., *Occurrence and Characterization of Psychrotrophic Bacillus cereus on Farms in the Netherlands*, Netherlands Milk & Dairy journal, Vol.49, p.125-138, 1995.
24. DUFRENNE, J., SOENTORO, P., TATINI, S., DAY, T., NOTERMANS, S., *Characteristics of Bacillus cereus Related to Safe Food Production*, International Journal of Food Microbiology, Vol.23, p.99-109, 1994.
25. NETTEN, P.V., MOOSDUK, A.V., HOENSEL, P.V., MOSSEL, D.A.A., PERALES, I., *Psychrotrophic Strains of Bacillus cereus Producing Enterotoxin*, Journal of Applied Bacteriology, Vol.69, p.73-79, 1990.
26. CHUNG, K.T., SUN, H.L., *Distribution and Characteristics of Bacillus cereus Isolated from Rice in Taiwan*, Journal of Food Science, Vol.51, No.5, 1986.
27. URAZ, G., ARSLAN, S., GÜNDOĞAN, N., *Çiğ Süt, Pastörize Süt ve Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen ve İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Varlığı Saptanan Bacillus Türleri*, Gıda Dergisi, Cilt.21(4), s.275-280, 1996.
28. UEDA, S., KATUBE, Y., KUWABARA, Y., *Studies on the Ecology of Bacillus cereus the Biochemical Characteristics of Bacillus cereus Strains Isolated from Food, Food Poisoning Outbreaks and Environment*, J. Antibact. Antifung. Agent., Vol.13, p.547-554, 1985.
29. LARSEN, H.D., JORGENSEN, K., *The Occurrence of Bacillus cereus in Danish Pasteurized Milk*, International Journal of Food Microbiology, Vol.34, p.179-186, 1997.
30. HIGUTI, H.I., MACENA, I.R., CORTIANO, L., BRANCO-FILHO, M.O., BLASKOWSKI, M.M.M., NASCIMENTO, A.J., *Characterization of Bacillus cereus Isolated from Corn and Cassava Flour Samples in Curitiba*, Revista de Microbiologia, Vol.28, p.46-48, 1997.
31. LANGEVELD, L.P.M., SPRONSEN, W.A.V., EMERENTIA, C.H., NOTERMANS, H.W., *Consumption by Healthy Adults of Pasteurized Milk with a High Concentration of Bacillus cereus; A Double-Blind Study*, Journal of Food Protection, Vol.59, No.7, p.723-726, 1996.
32. BECKER, H., SCHALLER, G., WIESE, W., TERPLAN, G., *Bacillus cereus in Infant Foods and Dried Milk Products*, International Journal of Food Microbiology, Vol.23, p.1-15, 1994.

33. SOOLTAN, J.R.A., MEAD, G.C., NORRIS, A.P., *Incidence and Growth Potential of Bacillus cereus in Poultrymeat Products*, Food Microbiology, Vol.4, p.347-351, 1987.
34. HOLT, J.G., PETER, H.A.S., LIPPINCOTT, WILLIAMS&WILKINS., *Genus Bacillus*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, p.1105-1139, 1984.
35. BALOWS, A., TRUPER, H.G., DWORKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K.H., SLEPECKY, R.A., HEMPHILL, H.E., *The Genus Bacillus-Nonmedical*, The Prokaryotes: A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application, p.1663-1696, 1992.
36. GÖKTAN, D., *Bacillus cereus Gıda Zehirlenmesi*, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Yayını, Cilt.2, Sayı.1, s.113-123, 1984.
37. HOLBROOK, R., ANDERSON, J.M., *An Improved Selective and Diagnostic Medium for the Isolation and Enumeration of Bacillus cereus in Foods*, Can. J. Microbiol., Vol.26, p.753-759, 1980
38. SZABO, R.A., TODD, C.D., RAYMAN, M.K., *Twenty-Four Hour Isolation and Confirmation of Bacillus cereus in Foods*, Journal of Food Protection, Vol.47, No.11, p.856-860, 1984.
39. HARMON, S.M., *New Method for Differentiating Members of the Bacillus cereus Group; Collaborative Study*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol.65, p.1134-1139, 1982.
40. LOGAN, N.A., BERKELEY, R.C.W., *Identification of Bacillus Strains Using the API System*, Journal of General Microbiology, Vol.130, p.1871-1882, 1984.
41. ZWIETERING, M.H., WIT, J.C., NOTERMANS, S., *Application of Predictive Microbiology to Estimate the Number of Bacillus cereus in Pasteurized Milk at the Point of Consumption*, International Journal of Food Microbiology, Vol.30, p.55-70, 1996.
42. NOTERMANS, S., DUFRENNE, J., TEUNIS, P., BEUMER, R., GIFFEL, M., WEEM, P.P., *A Risk Assessment Study of Bacillus cereus in Pasteurized Milk*, Food Microbiology, Vol.14, p.143-151, 1997.

43. GOEPFERT, J.M., SPIRA, W.M., KIM, H.U., *Bacillus cereus; Food Poisoning Organism*, J. Milk Food Technol., Vol.35, No.4, p.213-227, 1971.
44. VIOLA, D.G., LOPEZ, D., *Numerical Analysis of Electrophoretic Periplasmic Protein Patterns, a Possible Marker System for Epidemiologic Studies*, Journal of Clinical Microbiology, Vol.28, p.136-139, 1990.
45. MATAR, G.M., SLIEMAN, T.A., NABBUT, N.H., *Subtyping of Bacillus cereus by Total Cell Protein Patterns and Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction*, European Journal of Epidemiology, Vol.12, p.309-314, 1996.
46. LANCETTE, G.A., HARMON, S.M., *Enumeration and Confirmation of Bacillus cereus in Foods; Collaborative Study*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., No.63, p.581-586, 1980.
47. TAMER, A.Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M., OĞULTEKİN, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu*, Anadolu Üniv. Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No.74, Eskişehir, 1989.
48. BRADFORD, M.M., *Analyt. Biochem.*, Vol.72, p.248-254, 1976.
49. KLEMENT, Z., RUDOLPH, K., SANDS, D.C., *Methods in Phytobacteriology*, Budapest, 1990.
50. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, No.3, p.18.47-18.59, 1989.
51. ZEYTİNOĞLU, H., *Effects of the N-RAS Oncogene on Differentiation of CO25 Myoblast Cells*, Doktora Tezi, UEA, Norwich, İngiltere, 1992
52. HARMON, S.M., KAUTTER, D.A., McCLURE, F.D., *Comparison of Selective Plating Media for Enumeration of Bacillus cereus in Foods*, Journal of Food Protection, Vol.47, p.65-67, 1984