

**ESKİŞEHİR İLİNDE TÜKETİLEN
ET ve ET ÜRÜNLERİNDE
Bacillus cereus KONTAMİNASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Özgür AVCI
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık-2003

‘ Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonunca kabul edilen 011082 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.’

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özgür AVCI' nin Eskişehir İlinde Tüketilen Et ve Et Ürünlerinde *Bacillus cereus* Kontaminasyonunun Araştırılması başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi **29.12.2003**... tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Doc. Dr. Kıymet Güven	
Üye	: Yrd. Doc. Dr. Nalan Yılmaz-Sarıözlü	
Üye	: Yrd. Doc. Dr. Filiz Susuz	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun **07.01.2004**... tarih ve **1/4**... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Altuğ İFTAR
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ESKİŞEHİR İLİNDE TÜKETİLEN ET VE ET ÜRÜNLERİNDE
BACILLUS CEREUS KONTAMİNASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

ÖZGÜR AVCI

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Kıymet GÜVEN

2003, 64 sayfa

Bu çalışmada, Eskişehir’ de satışı sunulan et, kıyma, tavuk pirzola, sucuk ve pastırma örnekleri toplanmıştır. Örneklerde ki toplam bakteri sayımı PCA kullanılarak, *Bacillus cereus* sayımı ise MYP agar kullanılarak yapılmıştır. *Bacillus cereus* toplam hücre proteinlerinin analizi için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Örneklerden plazmid izolasyonu yapılmış, plazmide sahip olup-olmadıkları ve plazmid büyüklükleri araştırılmıştır.

Test edilen tüm örnekler içinden 2 adet sucuk örneğinin gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde *Bacillus cereus* içerdiği gözlenmiştir. Genel anlamda bütün *Bacillus cereus* izolatlarına ait protein profilleri SDS-PAGE ile birbirine benzer bulunmuştur. Bir et izolatı hariç, tüm izolatların plazmid içerdiği gözlenmiştir.

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

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF BACILLUS CEREUS CONTAMINATION
CONSUMPTION OF MEAT AND MEAT PRODUCT IN ESKİŞEHİR****OZGUR AVCI****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Programme****Supervisor: Doç. Dr. Kıymet GÜVEN****2003, 64 page**

In this study, meat, minced meat, chicken cutlet, sausage and pressed meat samples were collected from meat sellers in Eskişehir. Enumeration of total bacteria were carried out in these samples by using PCA, whereas *Bacillus cereus* enumeration has been done by using MYP medium. In addition analysis of total proteins of *Bacillus cereus* was carried out by means of SDS-PAGE metod. Plasmid was isolated in samples, then whether they have plasmid or was researched and their sizes were determined.

It was found that two samples of sausage contained significant levels of *Bacillus cereus* to cause food poisoning in all the samples tested. Protein profiles which belong to the samples, were found to be similar to each other. All, the samples contain plasmid, excluding one meat isolate.

Keywords: Food Poisoning, *Bacillus cereus*, SDS-PAGE, Plasmid

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi, anlayışı ve değerli yardımlarıyla bana destek olan danışmanım Sn. Doç. Dr. Kıymet GÜVEN' e, bilgilerinden ve kütüphanesinden yararlandığım Sn. Prof. Dr. Merih KIVANÇ' a, değerli yardımları ve uyarılarıyla destek olan Sn. Araş. Gör. M. Burçin MUTLU' ya yardımlarını esirgemeyen Sn. Uz. Erdoğan ÇAKIR' a,

Çalışmalarım boyunca desteklerini ve yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim arkadaşlarım İ. Serdar ÖZKÜTÜK, Evrim İPEK, Cevat AKTAŞ ve sayamadığım tüm arkadaşlarıma,

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve daima yanımda olan aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

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. Gıda Maddelerinde Bacillus cereus' un Varlığı	4
1.3. Bacillus cereus' un Genel Özellikleri	7
1.4. Protein Profil Analizi	9
1.5. Plazmid Profil Analizi	10
1.6. Amaç.....	12
2 . MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
2 .1 . MATERYAL	13
2.1.1 .Örneklerin alınması	13
2.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Ekipman.....	13
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	13
2.1.3.1. Mannitol Egg Yolk Poymyxin B Agar (MYP)	13
2.1.3.2. Yumurta Sarısı Emülsiyonu	14
2.1.3.3. Plate Count Agar	14
2.1.3.4. %1' lik Peptonlu Su	14
2.1.3.5. Nutrient Agar	15
2.1.3.6. Nutrient Broth	15
2.1.3.7. Voges- Proskauer (VP) Besiyeri.....	15
2.1.3.8. Glukoz Broth.....	15
2.1.3.9. Nitrat Broth	16
2.1.3.10. Kristal Viyole Solüsyonu	16

2.2.2.6. Hemoliz Testi	26
2.2.3. Toplam Hücre Proteinlerinin Elde Edilmesi	26
2.2.4. SDS- Poliakrilamid Jel Elektforezi	27
2.2.5. Plazmid İzolasyonu	28
2.2.6. Agaroz jel Elektforezi	29
3. BULGULAR	30
3.1. İncelenen Örneklerdeki Mikroorganizma Sayıları	30
3.1.1. Parça Et Örneklerindeki Mikroorganizma sayıları	30
3.1.2. Kıyma Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları	32
3.1.3. Tavuk Pirzola Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları	32
3.2.4. Et Sucuk Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları	35
3.1.5. Et Pastırma Örneklerinde Mikroorganizma Sayıları	35
3.2. Elde Edilen İzolatlara Uygulanan İdentifikasyon Testleri	38
3.2.1. Gram Boyama ve Hücre Morfolojisi	39
3.2.2. Glukozdan Asit ve Gaz Oluşturma	39
3.2.3. Hemoliz Testi	39
3.2.4. Nitrat Redüksiyonu	39
3.2.5. Voges- Proskauer Reaksiyonu	40
3.2.6. Katalaz Testi	40
3.3 Toplam Hücre Proteinlerinin Eldesi ve SDS Poliakrilamid Jel Elektforezi	44
3.4. Plazmid Eldesi ve Agaroz Jel Elektforezi	47
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
5. KAYNAKLAR	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1 Standart <i>Bacillus cereus</i> NRRL B 3711' in MYP agarda görünümü	38
3.2 Glukozdan asit ve gaz oluşumu, Voges proskauer reaksiyonu, Nitrat Redüksiyonu test sonuçları	41
3.3. <i>Bacillus cereus</i> izolatlarının toplam hücre proteinlerine ait SDS-PAGE profilleri	44
3.4. <i>Bacillus cereus</i> izolatlarından elde edilen protein örneklerinin SDS-PAGE profilleri	45
3.5. <i>Bacillus cereus</i> izolatlarından elde edilmiş plazmidlerin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	47
3.6. <i>Bacillus cereus</i> izolatlarından elde edilmiş plazmidlerin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1 Gıdalarla bulaşan bakteriyel kökenli hastalıklar, etmenleri ve özellikleri.....	3
3.1. Parça et örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı.....	31
3.2. Çiğ kıyma örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı.....	33
3.3. Çiğ tavuk pirzola örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> vejetatif hücre sayısı	34
3.4. Et sucuk örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı.....	36
3.5. Et pastırma örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı.....	37
3.2. Glukozdan asit ve gaz oluşumu, voges proskauer reaksiyonu, Nitrat Redüksiyonu test sonuçları	41
3.6. İdentifikasyon test sonuçları	42
3.6. (Devam) İdentifikasyon test sonuçları	43

1. GİRİŞ

İnsanların gıda maddelerinde bulunan mikroorganizmaları ne zaman fark ettikleri hakkında kesin bir tarih vermek mümkün değildir. Bununla birlikte, bu olayın mikrobiyolojinin bir bilim dalı olarak ortaya çıkmasında çok önemli olduğu kabul edilen bir gerçektir. İnsanın gelişim evresi “gıdaların toplandığı” ve “gıdaların üretildiği” dönemler olarak ikiye ayrılabilir. Gıdaların üretilmesi ise 8-10 bin yıl önce başlamıştır. İnsanların gıdaların bozulması ve gıda zehirlenmeleri gibi sorunlarla bu dönemin başında karşılaşmaya başladıkları sanılmaktadır. Hazırlanmış gıdaların bozulmasına ait ilk bulgular, M.Ö. 6000 civarına rastlamaktadır. 1658 yılında A. Kircher adında bir keşiş mikroorganizmaların gıdaların bozulmasında rol oynadığını belki de ilk ileri süren kişidir. Daha sonraları 1765’ te L. Spallanzani kaynatıldıktan sonra sıkı bir şekilde kapatılmış bir kapta saklanan et suyunun bozulmadığını göstermiştir. Spallanzani bunu spontan generasyon doktrinini çürütmek amacıyla yapmış ancak, bu işlemde spontan generasyonunun hayati ögesi olan oksijenle ilişkiyi kestiği için kabul ettirememiştir. 1873’ te Schwann bu teoriyi havayı kızgın bir bobin üzerinden geçirip ortama vererek, hava bulunması halinde de gelişme olmadığını göstererek ispatlamıştır. Bu araştırmacılar ısı ile gıda muhafazasını teorik olarak geliştirdikleri halde, bunu uygulamaya aktaramamışlardır. 1809 yılında bir şekerleme ustası olan F. Appert eti cam kavanoz içinde kaynatarak muhafaza etmeyi başarmıştır. Gıdalarda bulunan mikroorganizmaların önemi ve oynadıkları rolü ilk anlayan ve gösteren kişi ise L. Pasteur’dür. 1860’ da şarap ve birada istenmeyen mikroorganizmaları yok etmek için ilk defa ısı uygulamıştır. Böylece günümüzde de gıda muhafazasında yaygın olarak kullanılan pastörizasyon uygulamalarının temeli atılmıştır. [1]

Gıdalar çeşitli faktörlere bağlı olarak değişen sayı ve cinslerde mikroorganizma içermekte; hasat aşamasından itibaren her üretim basamağında mikrobiyal kontaminasyona maruz kalmaktadırlar. Kontaminasyon etkeni mikroorganizmalar gıda bozulmalarına gıda zehirlenmelerine (intoksikasyon) ve gıda kaynaklı hastalıklara (enfeksiyon) neden olmakta, sonuçta önemli ekonomik kayıplara ve sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır [2].

Gıdalara çeşitli şekillerde bulaşan mikroorganizmalar onları çoğu kez kendi gelişmeleri için besin kaynağı olarak kullanırlar. Bu durum ise gıdaların bozulmasına neden olmaktadır. Gıdalara bulaşan mikroorganizmalar patojen nitelikte oldukları takdirde gıdalar ayrıca sağlık açısından riskli duruma girerler.

1.1. Gıdalardan Kaynaklanan Mikrobiyal Kökenli Hastalıklar

Klasik olarak, gıdaların yenilmesinden belirli bir süre sonra, bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal, baş dönmesi, bazen ateş veya görme, işitme, hareket gibi sinir sistemi bozukluklarından bir kısmının belirmesiyle tanınan sağlık bozuklukları veya hastalıklara topluca gıda zehirlenmeleri (gıda enfeksiyonları ve intoksikasyonları) adı verilir [3]. Gıda kökenli bakteriyel hastalıkların nedenleri ve bazı özellikleri Çizelge 1.1' de verilmiştir [1,4].

Hastalık ve zehirlenmelerin ortaya çıkışında vücuda giren mikroorganizma veya toksin miktarı birinci derecede önemli olmakla beraber, kişinin genel direnci ve beraber alınan diğer gıdalarda hastalanma veya zehirlenmelerde etkili olmaktadır. Hastalık etmenini taşıyan gıda ile birlikte alınan diğer gıdaların etkisine en tipik örnekler ise özellikle et ürünlerinin mide pH' sını yükseltmesi ve etmenin kolaylıkla geçmesine izin verilmesi, mayonez gibi yağlı gıdalarda yağ globülleri arasında mikroorganizmanın gizlenmesi ve aynı şekilde midenin düşük pH' sından etkilenmemesidir [3].

Gıda zehirlenmelerinde istatistiki bilgilerin sağlıklı olmamasına karşın gıda enfeksiyonlarında ve intoksikasyonlarında istatistikler *Staphylococcus aureus*' un sebep olduğu intoksikasyonların *Salmonella*' dan daha fazla olduğunu belirtmektedir. Yurdumuzda genellikle gıda zehirlenmesine neden olan organizmalar olarak *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Bacillus cereus* bilinmektedir [3].

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

Hastalık	Etken Bakteri	Hastalık Süresi	Riskli Olabilecek Gıdalar
Şarbon	<i>Bacillus anthracis</i>	Haftalar	Kontamine olmuş ve yetersiz pişirilmiş et
Basil zehirlenmesi	<i>Bacillus cereus</i>	24-48 saat	Et, et suyu, pişmiş pirinç ve uygun koşullarda saklanmayan pişirilmiş gıdalar
Brusellosis Malta Humması	<i>Brucella abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. suis</i>	Haftalar	Çiğ süt, pastörize süttten yapılmış süttten yapılmış keçi peyniri, kontamine olmuş etler
Campylosis	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>C. coli</i>	2-10 gün	Çiğ ve az pişmiş kümes hayvanları, pastörize edilmemiş süt, kontamine olmuş su
Botulizm	<i>Clostridium botulinum</i>	Değişken	Düşük asit içerikli yada uygunsuz şekilde evde veya ticari amaçlı kavanozlanmış gıdalar, evde kavanozlanmış veya fermente edilmiş balıklar, alüminyum folyoda pişmiş patates, peynir sosu, şişelenmiş sarımsak
Clostridium zehirlenmesi	<i>Clostridium perfringens</i>	24-48 saat	Etlerde, kanatlı etlerinde, et suyunda, kurutulmuş ve yetersiz ısı işlem uygulanmış gıdalar
Koliform zehirlenmesi	<i>E. coli (EHEC)</i> <i>E. coli (STEC)</i>	5-10 gün	Pastörize edilmemiş süt ve meyve suyu, az pişmiş biftek, çiğ sebze-meyve, salam, soslu salata, kontamine olmuş sular
Literiosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	Değişken	Isıl işlem uygulanmış et, taze yumuşak peynir, pastörize edilmemiş yada uygunsuz pastörize edilmiş süt
<i>Staphylococcus</i> zehirlenmesi	<i>Staphylococcus aureus</i>	24-48 saat	Dondurulmamış yada uygun koşullar altında dondurulmamış et, yumurtalı ve patatesli salatalar, kremalı pastalar
Vibrio zehirlenmesi	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2-5 gün	Balık ve midye gibi çiğ veya az pişmiş deniz ürünlerinde
Kolera	<i>Vibrio cholerae</i>	3-7 gün	Kontamine olmuş su, balık, midye, tüketime hazır gıdalar
Yersiniosis	<i>Yersinia enterocolytica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>	1-3 hafta	Az pişmiş domuz eti, pastörize edilmemiş süt, kontamine olmuş su
Salmonellosis (Tifo)	<i>Salmonella typhi</i>	4-7 gün	Kontamine olmuş et, meyve-sebze ve yumurta, kanatlı etleri, pastörize edilmemiş süt ve meyve suları
Shigellosis (Dizenteri)	<i>Shigella sonnei</i> <i>S. dysenteriae</i> <i>S. boydii</i> <i>S. flexneri</i>	4-7 gün	Fecal kaynaklı kontamine olmuş su ve gıdalar, süt, çiğ sebzeler, yumurtalı salatalar, tüketime hazır gıdalar

1.2. Gıda Maddelerinde *Bacillus cereus*' un Varlığı

Bacillus cereus doğada yaygın olarak bulunan ve gıda zehirlenmelerine neden olan patojen bir mikroorganizmadır. Bir yandan fermentatif etkisiyle gıda maddelerinde kokuşmaya varan bozulmalara neden olurken diğer yandan da ısıya dirençli sporlarıyla gıda hijyeni yönünden ayrı bir önem taşır [5]. Özellikle *Bacillus cereus* ile kontamine olmuş gıdalar pişirildikten sonra yeterince ve hızlı soğutulmadıklarında veya gıdaların hazırlanması ile tüketimi arasındaki süre uzadığında canlı ve ısıya dirençli olan sporların çimlenmesi sonucu organizma çoğalıp, gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde toksin oluşturabilir [4].

Gastroenteritis' in iki farklı tipi *Bacillus cereus* gıda zehirlenmesi ile ilişkilidir. Bunlardan biri "akut başlayan kusma tipi sendrom" olup çok pişmiş pirinç ve pirinçli gıdalarda oluşan toksinle ilişkilidir. Emetik (kusturucu) toksin olarak isimlendirilen bu toksin ısı ile pH' nın yanı sıra tripsin ve pepsin enzimlerine de dirençlidir. Diğer "uzun sürede gelişen diyare tipi sendrom" olarak bilinmektedir. Diyare toksin ise protein yapısında olup, tripsin ve pronaz enzimleri ile ısıya duyarlıdır. Toksinin içinde bulunduğu gıda grubu olarak mısır ve mısır nişastası başta olmak üzere hububat içeren gıdalar, patates püresi, sebzeler, kıyma, bazı et ürünleri, puding ve çorbaları sayılabilir [3,6,7]. Diyare sendrom gıdanın alımından 8-16 saat sonra beliren karın ağrısı ve diyare ile sonuçlanırken, bu tip *Bacillus cereus* zehirlenmesi, *Clostridium perfringens* gıda zehirlenmesi ile benzerlik gösterir. Emetik toksin gıda alımından 1-5 saat sonra etkisini gösterir ve zehirlenme *Staphylococcus aureus* gıda zehirlenmesine benzerlik gösterir [3,8]. *Bacillus cereus*' un gıda zehirlenmesine neden olabilecek seviyelerde toksin üretebilmesi için $>10^6$ cfu/g gibi yüksek seviyelerde bulunması gerekmektedir [9].

Konuma ve ark. [10] tarafından Japonya' da yapılan bir araştırmada çiğ et, et ürünleri ve et katkı maddelerini içeren 1963 örnek Japonya' nın çeşitli vilayetlerindeki et marketlerinden, et işleme fabrikalarından ve mezbahalardan toplanarak *Bacillus cereus*' un mevcudiyeti ve sayısı yönünden incelenmiştir. Et ürünlerinden % 18.3 oranında, çiğ etten ise % 6.6 oranında *Bacillus cereus* izole edilmiş ve bu ürünlerin kontaminasyon düzeyleri genelde gramda 10^2 cfu/g' dan

daha düşük bulunmuştur. Diğer taraftan et katkı maddelerinde % 39.1 oranında *Bacillus cereus* izole edilmiştir. Kontaminasyon düzeyleri genellikle gramda 10^2 – 10^4 cfu/g arasında bulunurken özellikle hayvansal proteinlerde ve baharatta gramda 10^4 cfu/g aşmıştır. Bu sonuçlardan hareketle et ürünlerinde *Bacillus cereus* kontaminasyonunun kaynağının kontamine et katkı maddeleri olduğu bildirilmiştir.

Ternstöm ve Molin [11] tavuk, sığır ve domuz etlerinde yaptıkları bir araştırmada toplam 135 çiğ et örneğinde *Bacillus cereus* aramışlardır. 45' er örnekli gruplardan domuz etinde %7, sığır etinde % 11 oranında *Bacillus cereus* izole edilirken tavuk etinde *Bacillus cereus* izole edilememiştir.

Mısır' da, et ürünlerinde yapılan bir araştırmada analize alınan 150 örneğin 34' ü (% 22.6) *Bacillus cereus* içermiştir. Bu çalışma kapsamında yer alan 100 kıyma örneğinden 18' i (% 18), 25 sucuk örneğinden 7' si (% 28) ve 25 pastırma örneğinden 9' u (% 36) *Bacillus cereus* ile kontamine bulunmuştur [12].

Kavurma ve kanatlı eti tüketime bağlı olarak *Bacillus cereus*' un gıda zehirlenmelerine sebep olduğu da bildirilmiştir. Sooltan ve ark. taze veya dondurulmuş, çiğ yada pişirilmiş toplam 102 kanatlı et ürünü örneğinden % 6.9 oranında *Bacillus cereus* izole etmişlerdir. Sharma ve ark. 1992 yılında Hindistan' da yaptıkları bir araştırmada tavuk sosis, tavuk salam, kokteyl sosis, şiş kebab ve domuz salamı örneklerinde gramda 2.1×10^5 – 4.7×10^5 cfu/g arasında *Bacillus cereus* bulmuşlardır [12].

Vazgeçer ve ark. [13] Ankara' da bulunan 72 ayrı restorandan alınan 72 adet pişirilmiş tavuk döner üzerinde yapmış oldukları çalışmada örnekler kimyasal ve mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir. Bu örneklerin % 48' inde örnekler içindeki sayıları 10^2 cfu/g dan az olmak üzere *Bacillus cereus* kontaminasyonu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca pişirilmiş tavuk döner örneklerinin %17' sinden *Bacillus cereus* sayıları 10^2 - 10^3 cfu/g arasında bulunurken, % 35' inde 10^3 - 10^4 cfu/g olarak bildirilmiştir.

Fang ve ark. [14] 1999- 2000 yılları arasında Tayvan' nın merkezinde bulunan süper marketlerde 18 °C' de saklanan RTE (tüketime hazır halde bulunan) gıda ürünleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada, toplam 164 örneği mikrobiyal kalitelerini belirlemek üzere incelemeye almışlardır. Daha çok et ve

jambon içerikli olan RTE gıda örneklerinin % 62.5' i *Bacillus cereus* ile kontamine halde bulunmuştur. Ayrıca deniz yosunu içine sarılmış pirinç toplarının (suşi) % 56' sının, soğuk şehriye örneklerinin %66.7' sinde *Bacillus cereus* varlığı belirlenmiştir.

Nel ve ark. [15] Güney Afrika' da bulunan mezbahalarda kesimi yapılmış kırmızı etler üzerinde yapmış oldukları çalışmada çeşitli patojen bakterilerin varlığı analiz edilmiştir. Bu çalışmada incelenen et örneklerinde *Bacillus cereus* sayısı ortalama olarak 8.32×10^3 cfu/g olarak belirlenmiştir.

Nortje ve ark. [16] Güney Afrika' da satışa sunulan et çeşitleriyle yapmış oldukları çalışmada ezilmiş sığır eti, ızgara tavuk, işlenmiş et çeşitleri olan sucuk, salam, jambon örnekleri test edilmiş ve *Bacillus cereus* kontaminasyonu araştırılmıştır. Teste alınan toplam 51 et örneğinin 1 ızgara tavuk örneği, 3 salam örneği (% 5.9), 5 sucuk örneği (% 9.8) *Bacillus cereus* ile kontamine bulunurken; ezilmiş sığır eti ve jambonda *Bacillus cereus* kontaminasyonu saptanmamıştır. İşlenmiş et ürünü örneklerinde ki *Bacillus cereus* sayıları ise sucuk örneklerinde 1×10^4 - 5×10^8 cfu/g arasında bulunurken, salam örneklerindeki seviyesi 6.3×10^4 - 1×10^8 cfu/g olarak tespit edilmiştir.

Schlegelova ve ark. [17] tarafından yapılan bir çalışmada toplam 161 gıda ham madde örneğinde *Bacillus cereus* kontaminasyonu araştırılmıştır. Analiz edilen et ürünü örneklerinin 31' i (% 28) ve kuru gıda örneklerinin 66' sı (% 31), kaymaklı süt ürünlerinden ise yalnız 1 tanesi *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bulunmuştur. Teknolojik yöntemlerle ısıl işlemden geçirilen çok yağlı süt örneklerinden %63' ünün, yine ısıl işlem uygulanan et ürünlerinden %48' inin önemli ölçüde *Bacillus cereus* ile kontamine olduğu gözlenmiştir.

Sarrias ve ark. [18] İspanya' da yapmış oldukları çalışmada dayanıklılığı analiz edilen 61 çiğ pirinç örneklerinin 61' inin de *Bacillus cereus* ile kontamine olduğu gözlenmiştir. Dayanıklı olarak analiz edilen beyaz pirinçlerin içinde bulunan *Bacillus cereus* sayısı 10^2 cfu/g dan daha az bulunurken, dayanıksız olarak analiz edilen pirinç örneklerinde *Bacillus cereus* sayısının yoğunluğu 10^3 cfu/g' ın üzerinde bulunmuştur.

Blakey ve ark. [19] 12 farklı çeşitte bakliyat ve tahıl içeren kuru gıdalarla yapmış oldukları çalışmada inceledikleri 39 gıda örneğinin %56' sını *Bacillus*

cereus ile kontamine olduğunu bulmuşlardır. Bu gıdalardaki *Bacillus cereus* sayıları 1×10^2 - 6×10^4 olarak belirlenmiştir.

Bacillus cereus' un gıda zehirlenmesine neden olabilmesi için şüpheli gıdanın her gramında $>10^5$ kadar mikroorganizma bulunması gerektiği bildirilmiştir [20,21].

1.3. *Bacillus cereus*' un Genel Özellikleri

Bacillaceae familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *Bacillus cereus* toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. 1- 1,2 μm ile 3.0- 5.0 μm arasında hücre boyutuna sahiptir. Gram (+), büyük çubuklar şeklindeki bu bakteri aerobik ve fakültatif anaerobik koşullar altında gelişebilmektedir. Bu bakterinin genel olarak geliştiği sıcaklık aralığı 10- 48 $^{\circ}\text{C}$ iken optimum olarak gelişme gösterdikleri sıcaklık aralığı 28- 35 $^{\circ}\text{C}$ arasındadır. Sentral yada subterminal yapıda, elipsoidal spora sahip olan bakteri, tipik peritrik flagellaları sayesinde hareketlidir. Hemolisin salgılayan *Bacillus cereus*, lesitinaz, proteaz, amilaz aktivitesine sahip olup nitratı nitrite indirger ve polimiksin antibiyotiğine karşı dirençlidir, ayrıca % 0.001 lizozim varlığında gelişebilir. Geniş bir pH aralığında (pH 4.9- 9.3) gelişim gösteren *Bacillus cereus*' un birçok suşu da yaklaşık % 7.5 konsantrasyondaki tuzda üreyebilir [3,9,20,21].

Bacillus cereus' un izolasyonu için en geçerli besiyeri MYP (Mannitol-EggYolk- Polymyxin) (Mossel ve ark. 1967) agardır. MYP agara yakın tanımlama değerine sahip diğer bir seçici besiyeri de PEMPA (Polymyxin- Egg Yolk- Mannitol Bromothymol Blue Agar) (Holbrook ve Anderson, 1980)' dir. Bu iki besiyerinde organizmanın seçici özelliği olarak, polimiksine direnci gözlenmektedir. Ayrıca identifikasyon için, lesitinaz üretimi sonucunda gelişen koloniler etrafında bir presipitasyon halkası oluşması ve mannitolün karbon kaynağı olarak kullanılamaması gibi karakteristik özellikleri açısından her iki besiyeri de esas alınmaktadır [9,22]. *Bacillus cereus* MYP agar üzerinde yuvarlak, pembe, yarı şeffaf, etrafını opak egg-yolk presipitasyon halkası sarmış olan koloniler oluşturur. Goepfert ve ark. 1972' de, Harmon ve ark. 1992 yılında MYP agarın en büyük dezavantajı olarak, ayrı koloniler etrafında oluşan zonların birleşmesinin koloni sayımında zorluğa neden olduğunu bildirmişlerdir [23].

Bacillus cereus PEMPA besiyerinde turkuaz mavisi renge, iri, düzensiz kenarlı koloniler oluşturur. PEMPA besiyerinde sodyum pürivat ilavesi rhizoid koloni oluşumunu azaltır ve egg-yolk reaksiyonunu geliştirmesine karşın besiyerinde *Bacillus cereus* dışındaki mikroorganizmalarda bazen yoğun şekilde ürediğinden şüpheli kolonilerin saflaştırılmaları biyokimyasal testlerden daima daha önce gelmektedir [24,25].

MYP ve PEMPA gibi kullanılan seçici besiyerlerinin dezavantajı diğer mikroorganizmaların gelişiminin tanımlanmak istenen *Bacillus cereus*' un hiçbir besiyeri modeli tarafından tamamen inhibe edilememesidir. Bu seçici besiyerleri üzerinde gelişen *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycooides* benzer şekilde egg-yolk reaksiyonuna pozitif sonuç veren diğer *Bacillus spp.*' dir [21,23].

Katı besiyerinden izole edilen *Bacillus cereus* kolonilerinin identifiye edilebilmesi için hemoliz reaksiyonu, glikozdan asit oluşturma, Voges-Proskauer reaksiyonu, nitratı nitrite indirgeme, katalaz testleri gibi çeşitli biyokimyasal testler uygulanması önerilmektedir [26]. Bu testlere ilave olarak jelatinaz, rhizoidal büyüme, toksin kristallerinin tanımlanması, tirozin bozulması, anaerobik olarak glikoz fermentasyonu ve lizozime direnç testleri de *Bacillus cereus* identifikasyonu için uygulanabilmektedir [7].

Bacillus cereus' un sayımı ve identifikasyonu için uygulanan standart analiz yöntemlerinden biri olan ISO metodu (Borge ve ark., 2001), sayım için MYP agar besiyerine ekim yapılmasını, identifikasyonu için Voges- Proskauer, nitrat reaksiyonu, glukoz fermentasyonu testlerinin uygulanmasını önermektedir. USDA/ FSIS Mikrobiyoloji Laboratuvarı (Lattuada ve McClain, 1998), örneklerde *Bacillus cereus* sayımı için MYP agar kullanımına, identifikasyonu için hemolitik aktivite, hareketlilik, gelişme karakteristikleri (rhizoidal gelişme) ve protein toksin kristallerinin üretimi testlerini önermektedir [22]. *Bacillus cereus*' un identifikasyonu için hızlı test sistemleri de geliştirilmiştir. API 50 CH, API 20E (Logan ve ark. 1985, Weber ve ark., 1988, Guinebretiere ve ark., 2001) geliştirilen sistemlerdendir [26,30]. Lagan ve ark. 1979 yılında emetik *Bacillus cereus* strainlerinin API sistem kullanılarak diyarel ve toksijenik olmayan *Bacillus*

cereus strainlerinden ayırt edilebileceğini, fakat farklı karakterlerinin tanımlanamayacağını belirtmiştir [19].

1.4. Protein Profil Analizi

Mikroorganizmaların ilk identifikasyon ve tiplendirme çalışmaları 18 yy' da Müller tarafından ışık mikroskobuna dayalı morfolojik kriterlere göre yapılmaya başlandı. Mikroorganizmaların izolasyonu ve saf kültür halinde üretimi tekniklerinin gelişimi ile bakteri metabolizmasının daha iyi anlaşılması sınıflandırmaya hareketlilik, besinsel istekler, boyanma özelliği, asit üretimi, pigmentasyon ve spor oluşturma gibi fizyolojik ve biyokimyasal bilgileri ekledi.

Geleneksel taksonomik yöntemlerin sınırlı olduğunun farkına varılmasından sonra, mikrobiyal identifikasyon ve sınıflandırmada moleküler identifikasyon ve tiplendirme yöntemlerinin, özellikle moleküler genetik ve serolojik esaslı testlerin giderek rutin analizlere girmesi sonucu daha doğru bilgiler elde edilmeye başlanmıştır.

Proteinler, mikroorganizmalarda çeşitli yapısal ve metabolik fonksiyonları gerçekleştirirler. Bu fonksiyonel farklılık, proteinlerin fiziksel yapılarında da gözlenir. Mikrobiyal proteinlere dayalı, protein elektroforezi bakteri sınıflandırmasında ve identifikasyonunda gerçek anlamda bir öneme sahiptir. Farklı elektroforetik tekniklerin her biri kendine ait ayırma seviyelerine ve uygulama alanlarına sahiptir. Hücre proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre elektroforetik ayrımının yapılması tür seviyesinin de aşağısında benzer strainler üzerindeki bilginin elde edilmesinde duyarlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Elektroforez edilen protein örneklerinin sağladığı karşılaştırma aynı zamanda bakteri genomuyla bağlantılı güvenilir ölçüler olarak kabul edilmektedir. Sonuçta uygun elektroforetik metodlarla protein analizi yapmak bir bakterinin taksonomik seviyede karakterizasyonunda ve identifikasyonunda uygulanabilen bir yöntemdir [27].

SDS-PAGE ile toplam hücre proteinlerinin analizi son zamanlarda kurulan bakteri identifikasyonu için oldukça kullanışlı bir yöntemdir. SDS-PAGE toplam hücre proteinlerini ve ekstraselüler protein ekstraktlarını kolayca tek tipe indirebilecek nispeten hızlı ve basit bir yöntemdir [27].

Toplam hücre proteinlerinin elektroforezi ile tür strainleri, özellikle büyük proteinlerde benzer profiller oluşturmaktadır. Böylece önemli genom parçalarının kodlamış olduğu proteinlerle bu teknik kullanılarak hem farklı mikroorganizmalar arasında karşılaştırmalı çalışmalar yapılabilen hem de strain seviyesinde akrabalık ilişkileri gözlenebilmektedir [28]. Çok sık kullanılan bir yöntem olmasına karşın *Bacillus cereus*' un protein profil analizi ile ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır.

Matar ve ark. [29] yapmış oldukları çalışmada çevresel ve klinik kaynaklardan elde edilen 58 *Bacillus cereus* izolatu biyokimyasal özellikleri, antibiyotik duyarlılığı ve toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE' de oluşturdukları profiller dikkate alınarak incelenmiştir. Tüm izolatların lesitinaz üretimi, jelatin hidrolizi, hareketlilik ve nitrat üretimi testlerinde pozitif, buna karşın parasporal kristal üretimi ve mannitol fermentasyonu testlerinde negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. Antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili 9 farklı antibiyotik kullanılarak yapılan çalışmada 58 *Bacillus cereus* izolatından 55' i aynı grup altında toplanırken 2 izolatın ve ayrıca 1 izolatında farklı gruplarda olduğu gözlenmiştir. Toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE' de vermiş olduğu profillerde 58 *Bacillus cereus* izolatının 22 değişik protein profili oluşturarak 22 farklı grup olarak gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada *Bacillus cereus* izolatlarının SDS-PAGE' deki protein profillerinin yüksek oranda heterojenite gösterdiği bildirilmiştir.

1.5. Plazmid Profil Analizi

Çeşitli mikroorganizmaların tiplendirilmesinde proteinlerin ve lipoproteinlerin incelenmesi başarılı olmakla birlikte bu yöntemler bir mikroorganizmanın fenotipini analiz ettikleri için sınırlı kullanıma sahiptirler. Çünkü bu tip analiz, proteinleri ve lipopolisakkaritleri kodlayan, belli genlerin ekspirasyonuna dayanmaktadır. Dolayısıyla pek çok araştırmacı bir organizmayı fenotipik çeşitliliğe maruz kalmadan genotipini analiz etmeyi tercih etmektedir. Bu nedenle mikrobiyal taksonomistler, türleri tanımlamak ve farklı organizmalar

arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak için nükleik asit hibridizasyonu ve sekans analizleri gibi yöntemleri sıklıkla kullanmaya başlamışlardır.

Mikroorganizmaların genetik materyalinin analizinde incelenmesi en kolay nükleik asit moleküller, plazmidlerdir. Birçok bakteri ana kromozomlarına ek olarak çok sayıda ince dairesel DNA molekülüne sahiptir. Plazmid olarak adlandırılan bu minikromozomlar, baştan ana kromozoma bağlanamayan ve kanamisin yada tetrasiklin olarak bilinen antibiyotiklere direnci sağlayan genleri taşıyan genetik materyaller olarak not edilmiştir [20]. Önceleri, bakterilerin bazı özelliklerini yöneten ve kromozom yapısına girebilen bu genetik elementlere, kromozomdan ayırabilmek için Jacob ve Wolman tarafından episome adı verilmiştir. Daha sonra Lederberg, hiçbir zaman konakçı bakteri kromozomunun yapısına giremeyen benzer elementlere plazmid adı verilmesini önerdi. Yapılan incelemeler, plazmid kabul edilen birçok elementin konakçı kromozomuna integre olabildiklerini ortaya çıkardı. Plazmidler bakteriyel kromozomlara integre olabilen ve kopyası bir bakteri kromozomundan diğer bir bakteri hücreğine transfer edilebilen elementlerdir [8,30].

Plazmid DNA' yı kromozomal DNA' dan ayıran en önemli özelliği yapısal karmaşası ve düşük molekül ağırlığına sahip olmasıdır ve bu özellikleri plazmid DNA izolasyonu ve analizi için kullanılabilir. Hücre ekstratlarının pH 12 üzerine çıktığında DNA moleküllerinin paralel olmayan iplikleri arasındaki hidrojen bağları bozulur ve DNA tek iplikli hale dönüşür. Solüsyon hızlı bir şekilde nötralize edilirse , kromozomal DNA' nın aksine plazmid molekülleri tekrar eski sarmal halini alabilir. Bozulan kromozomal DNA arasından plazmid DNA molekülleri izole edilebilir. İzole edilen plazmid DNA analiz edilmeden önce agaroz jel üzerinde elektroforezle gözle görülür hale getirilir. Bu yöntemde horizontal (yatay) düzenekte, agarozun konsantasyonu görülmek istenen plazmidin tahmin edilen büyüklüğüne göre % 0.7- % 1 arasında tercih edilmek suretiyle, elektroforez yapılmaktadır. Elektroforez sonunda plazmidler ethidiyum bromid ile boyanmak suretiyle U.V. ışıkta (310 nm) gözle görülür hale getirilir. Jel üzerinde izole edilen plazmid DNA' sı boyutu bilinen standart DNA molekülleri ile karşılaştırılarak analizleri yapılabilir.

Ombui ve ark. [31] tarafından Kenya'da yapılan bir araştırmada sütün izole ettikleri 60 *Bacillus cereus* straini üzerinde plazmid profil analizleri ve genel olarak kullanılan 8 antimikrobiyal ajana hassasiyetleri ölçülmüştür. İzolatların % 72' sinin plazmid içerdđđi gözlenmiştir. Plazmid boyutları 0.1-60 megadalton (mDa) arasında 5 ayrı büyüklükte plazmid izole edilmiştir. Tüm izolatlar amfisiline dirençli, cotrimoxazole ve sulphamethoxazole dirençleri bir dereceye kadar yüksek seviyede bulunmuştur. Diğer antimikrobiyal ajanlara dirençlerinin oldukça düşük olduğu gözlenen izolatların streptomisine karşı hassasiyetleri de belirlenmiştir. İzolatların % 90.7' sinin oldukça dirençli olduğu gözlenmiş, buna karşın ilaca dirençlilik ile plazmid taşıyıcılığı arasında bir ilişki gözlenmemiştir.

1.6. Amaç

Bu çalışmada satışa sunulmuş olan çiğ et ve et ürünü örneklerinin toplam mikroorganizma yükü ve bir gıda patojeni olan *Bacillus cereus* vejetatif hücre varlığı araştırılmış, elde edilen izolatların fenotipik ve genotipik özelliklerine göre epidemiolojik araçlar kullanılarak identifikasyonu amaçlanmıştır.

2 . MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 . MATERYAL

2.1.1 .Örneklerin alınması

Bu çalışmada Eskişehir piyasasında tüketime sunulan toplam 125 adet et ürünü örneği *Bacillus cereus* varlığı yönünden incelenmiştir. Analize alınan örneklerin her biri çiğ halde olup et, kıyma, tavuk pırzola, sucuk, pastırma gruplarından 25'er adet örnek çeşitli semtlerden toplanmış, etiketlenmiş ve soğuk kutularda aynı gün içerisinde laboratuvara getirilerek incelemeye alınmıştır. Çalışmamızda kullanılan standart *Bacillus cereus* NRRL B 3711 United States Department of Agriculture, Agricultural Reseach Service' den temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Malzemeler ve Ekipman

Bu çalışmada kullanılan besiyerlerinin bazıları hazır olarak satın alınmış, bazı besiyerleri ile kimyasal çözelti ve ayıraçlar ise kaynaklarda belirtildiği şekilde laboratuvarımızda hazırlanarak kullanılmıştır.

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

2.1.3.1. Mannitol Egg Yolk Poymyxin B Agar (MYP)

Sığır eti ekstraktı	1.0 g
Pepton	10.0 g
D-Mannitol	10.0 g
Sodyum klorür(NaCl)	10.0 g
Fenol kırmızısı	0.025 g
Agar	12-18 g
Distile su	900 ml

pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 50 °C' e ayarlanmış su banyosunda soğutulan besiyerine 100 ml yumurta sarısı emülsiyonu ve Polymyxin B sülfat antibiyotiği (5-10 µg/ml [8-20])ilave edilerek steril petrilere dökülmüştür [26].

2.1.3.2. Yumurta Sarısı Emülsiyonu

Yumurtalar, sıvı deterjan içinde fırçalanarak yıkanmış ve akan su altında arındırılarak, 30 sn %95'lik etanole batırılıp ve sonra kurutulmuştur. Aseptik işlemlerle yumurta sarısı beyazından ayrılarak steril ölçekli bir silindire alınmış ve hacimce dört kısım steril su eklenerek, kuvvetlice karıştırılmıştır. Karışım 45 °C' e ayarlanmış su banyosunda 2 saat ısıtılmış. 0 °C–5 °C' de 18–24 saat arasında çökelek oluşumu için bırakılmıştır. Emülsiyonun üst tabakası aseptik olarak toplanmıştır [26].

2.1.3.3. Plate Count Agar

Tripton	5.0 g
Glukoz	1.0 g
Yeast extract	2.5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Karışım pH' sı 7.2' ye tamponlanmış ve 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [32].

2.1.3.4. %1' lik Peptonlu Su

Pepton	1.0 g
Distile su	1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [33].

2.1.3.5. Nutrient Agar

Et ekstrakt	3.0 g
Pepton	5.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

Karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [32].

2.1.3.6. Nutrient Broth

Et ekstraktı	5.0 g
Pepton	3.0 g
Distile su	1000 ml

Karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [32].

2.1.3.7. Voges- Proskauer (VP) Besiyeri

Pepton	7.0 g
Glikoz	5.0 g
Sodyum klorür (NaCl)	5.0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	5.0 g
Distile su	1000 ml

Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir [26].

2.1.3.8. Glukoz Broth

Et ekstraktı	0.3 g
Pepton	0.5 g

Glukoz	0.5 g
Fenol red	0.0025 g
Distile su	100 ml

Glukoz haricinde karışım 10' ar ml tüplere dağıtılmış ve durham tüpleri de ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [32]. Steril edilen her bir tüpteki besiyerlerine glukoz çözeltisi filtrasyon ile sterilize edilerek ilave edilmelidir [34]

2.1.3.9. Nitrat Broth

Pepton	0.5 g
Et ekstraktı	0.3 g
Potasyum nitrat (KNO ₃)	0.1 g
Distile su	100 ml

Karışım 5'er ml tüplere dağıtılmış, 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [26].

2.1.3.10. Kristal Viyole Solüsyonu

Kristal viyole	2.0 g
% 95' lik etil alkol	20 ml
Amonyum oxalat	0.8 g

Tüm maddeler 80 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür [32].

2.1.3.11. İyot Solüsyonu

İyot	1.0 g
Potasyum iyodür	2.0 g

Malzemeler 300 ml distile su içinde çözülerek kullanılmıştır [32].

2.1.3.12 Safranin Solüsyonu

Safranin	0.25 g
% 95' lik etanol	10 ml
Distile su	90 ml

Safranin etanolde çözülüp, distile su ilave edilerek iyice karıştırıldı, ve sonra filte kağıdından süzüldü [32].

2.1.3.13. α -Naftol Solüsyonu

α -Naftol	5.0 g
%95' lik etanol	100 ml

α -naftol etanolde çözülür. 0 °C -5 °C arası bir sıcaklıkta, hava geçirmez olarak kapatılmış kahverengi kültür erleninde saklandı [26].

2.1.2.14. %40' lık Potasyum Hidroksit (KOH) Çözeltisi

Potasyum hidroksit (KOH)	40.0 g
Kreatin	0.3 g
Distile su	100ml

Potasyum hidroksit suda iyice çözdürülmüş, daha sonra kreatin ilave edilmiştir [32].

2.1.3.15. α - Naftilamin Solüsyonu

α -Naftilamin	0.5 g
5N Asetik asit	100 ml

α -Naftilamin, asetik asitte çözüldürülerek hazırlanmıştır [32].

2.1.3.16. Sülfanilik Asit Çözeltisi

Sülfanilik asit	1.0 g
5N Asetik asit	125 ml

Sülfanilik asit, asetik asit içinde homojen olarak çözdürülerek hazırlanmıştır [32].

2.1.3.17. Tris Citrat

Tris	12.1 g
Sitrik asit	6.6 g
Distile su	1000 ml

PH'sı 7.0'a ayarlanarak otoklavda steril edilmiş ve +4 °C' de muhafaza edilmiştir [35]

2.1.3.18. %30 Acrylamide Karışımı

Acrylamide	%29
N,N ¹ -metilenbisacrylamide	%1

100 ml' ye deiyonize sıcak su ile tamamlanarak kullanılmıştır [36].

2.1.3.19. 1.5 M Tris

Tris	18.15 g
Distile su	100 ml

pH' sı 8.8'e ayarlanarak otoklavlanmıştır [36].

2.1.3.20. 1 M Tris

Tris	12.1 g
Distile su	100 ml

pH' sı 6.8' e ayarlanarak otoklavlanmıştır [36].

2.1.3.21. % 10 SDS

SDS	10 g
-----	------

100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır [36].

2.1.3.22. %10 AMPS Solüsyonu

Amonyumpersülfat	1 g
Deiyonize su	10 ml

Deiyonize su içinde amonyumpersülfat çözdürülmüş ve +4 °C' de saklanmıştır [36].

2.1.3.23. % 10' luk Ayırma Jeli (10 ml)

Distile su	4 ml
% 30 acrylamide karışımı (2.1.3.18)	3.3 ml
1.5 M Tris (pH 8.8) (2.1.3.19)	2.5 ml
% 10 SDS	0.1 ml
%10 AMPS	0.1 ml
TEMED (Sigma T9281)	0.004 ml

Malzemeler sırasıyla temiz bir şişeye aktarılarak jel donmadan elektroforez aletine boşaltılmıştır [36].

2.1.3.24. % 5' lik Yükleme Jeli (3 ml)

Distile su	2.1 ml
% 30 Acrylamde karışımı (2.1.3.18)	0.5 ml
1.0 M Tris (pH 6.8) (2.1.3.20)	0.38 ml
% 10 SDS	0.03 ml
% 10 AMPS	0.03 ml
TEMED (Sigma T9281)	0.003 ml

Tüm malzeme sırasıyla temiz bir şişede karıştırılarak jel donmadan elektroforez aygıtına boşaltılmıştır [36].

2.1.3.25. 2X SDS Jel Yükleme Tamponu

Tris HCl	100 mM
Dithiothreitol	200 mM
SDS	%4
Bromophenol blue	%2
Gliserol	%20

Tüm malzeme karıştırılarak hazırlanmış ve +4 °C' de muhafaza edilmiştir [36].

2.1.3.26. 5X Yürütme Tamponu

Tris	15.1 g
Glisin	94 g
Deiyonize su	900 ml
% 10 SDS	50 ml

Tris ve glisin deiyonize suda çözüldükten sonra SDS ilave edilerek 1000 ml' ye deiyonize su ile tamamlanmıştır [36].

2.1.3.27. Coomasie Brillant Blue (Jel Boyası)

Coomasie brillant blue R	0.25 g
Metanol	45 ml
Distile su	45 ml
Glacial asetik asit	10 ml

Malzemeler karıştırılarak whatman No. 1 filtre kağıdından süzölmüştür [36].

2.1.3.28. Yıkama Tamponu

Metanol	30 ml
Asetik asit	10 ml
Distile su	60 ml

Malzemeler karıştırılarak hazırlanmıştır [36].

2.1.3.29. Tris-EDTA

Tris (Sigma T-6066)	10 mM
EDTA (Fluka 03680)	1 mM

pH'sı 8.0' a ayarlanmış ve otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır [37].

2.1.3.30. Solüsyon I

Glukoz	50 mM
Tris-HCl	25 mM
EDTA (Fluka 03680)	10 mM

pH 8.0'a ayarlanmış, otoklavda steril edildikten sonra 4 °C' da saklanmıştır [37].

2.1.3.31. % 1 SDS

SDS	1 g
Distile su	100 ml

Karışım halinde hazırlanmıştır [37].

2.1.3.32. Solüsyon II

NaOH	0.2 N
SDS	%1

5 N NaOH stoktan deney sırasında taze olarak hazırlanmıştır [37].

2.1.3.33. Solüsyon III

5 M Potasyum asetat	60 ml
Glasiyel asetik asit	11.5 ml
Distile su	28.5 ml

Tüm malzeme karışım halinde hazırlanmıştır [37].

2.1.3.34. Tris- asetat (TAE) Tamponu pH 8.0 (50x / litre)

Trizma- base	242 g
Glasiyel asetik asit	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml

Malzemeler karışım halinde hazırlanmıştır [37]

2.1.3.35. Jel Yükleme Tamponu (“bromophenol blue”, BB)

EDTA	60 mM
------	-------

Gliserol	%6
Bromophenol blue	0.09 ml

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Örneklerin Analize Hazırlanması

Analiz edilecek örneklerin her birinden 10' ar gram tüketime sunulduğu şekli ile alınmış ve aynı gün laboratuvara getirilerek ekim için hazırlanmıştır [38]. 10 gram çiğ haldeki et veya et ürünü örnekleri % 0.1' lik peptonlu sudan 90 ml alınarak yüksek devirde blanderda homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan bu homojenattan 1 ml alınarak 9 ml % 0.1' lik steril peptonlu suda [39] 10^{-6} ' a kadar dilüsyonlar hazırlanmış tüm dilüsyonlardan ve homojen hale getirilmiş örnekten PCA' ya [10,14] 20 µl' lik damla ekimler yapılmıştır [10,14,38,39].

Bacillus cereus hücre sayımı için homojen hale getirilmiş örnekten 1 ml, diğer dilüsyonlardan ise 100 µl alınarak MYP' ye yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır [10]. Ekim yapılmış petriyer 30 °C' de 24-48 saat inkübe edildikten sonra toplam bakteri ve *Bacillus cereus* koloni sayımı yapılmıştır [5,10,26].

Tüm et ve et ürünü örneklerinin incelenmesi sonucunda MYP agarda gözlenen tipik *Bacillus cereus* kolonileri, MYP agarda saf kültür oldukları kontrol edildikten sonra izolasyon test işlemleri ile muamele edilmek üzere yatkı nutrient agarda ve % 15' lik gliserolde stoklanmıştır. Nutrient agar stokları +4 °C' de, gliserol stokları ise -85 °C' de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. Elde Edilen İzolatlara Uygulanan İdentifikasyon Testleri

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

2.2.2.1 Gram Boyama

Gram boyama yapmak için lam üzerine tespit edilmiş preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatıldı, iyot- lugol çözeltisi uygulandıktan sonra %96' lık etil alkol ile renksizleştirme işlemleri yapılmıştır. Daha sonra karşıt boya olan safranin damlatılan preparat, su ile yıkanmış kurumaya bırakılmıştır. Preparata immersiyon yağı damlatılmış preparat ve 100' lük objektifle incelenmiştir. [34]

2.2.2.2. Glukozdan Asit ve Gaz Oluşturma

Tanımlanacak taze bakteri kültüründen bir öze alınarak, içerisinde Durham tüpleri bulunan glukoz broth besiyerlerine ekilmiş ve 30 °C' lik etüvde 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüpler asit ve gaz oluşumu yönünden incelenmiştir. Asit oluşumu besiyerindeki indikatörün rengini kırmızıdan sarıya dönüşmesi ile, gaz oluşumu ise ters çevrili durumdaki Durham tüplerindeki gaz birikimi ile gözlenmiştir [32].

2.2.2.3. Voges Proskauer Reaksiyonu

Seçilmiş koloniler VP besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiş ve 30 °C' e ayarlanmış bir inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her tüpten temiz tüplere aktarılan 3 ml kültür üzerine 1.8 ml α - naftol solüsyonu ve 0.6 ml %40' lık KOH damlatılarak pembe renk oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir [32].

2.2.2.4. Nitrat Redüksiyonu

Tanımlanacak kültürler nitrat broth içeren tüplere inoküle edildikten sonra 30 °C' de 24- 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürler üzerine 250 μ l sülfanilik asit çözeltisi ve 250 μ l α - naftilamin solüsyonu

ilave edilmiş, ortamda nitrit varlığıyla bu iki çözelti karışımı pembemsi kırmızı renkli bir bileşik oluşturmasıyla pozitif sonuç vermiştir [32].

2.2.2.5. Katalaz Testi

Nutrient agara inoküle edilen taze kültürün 24- 48 saat 30' °C de inkübe edilerek gelişimi sağlamış, süre sonunda kültürler üzerine H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığı gözlenmiştir. H₂O₂ damlatıldıktan sonra gaz çıkışının olması pozitif sonuç olarak değerlendirilir [32].

2.2.2.6. Hemoliz Testi

Nütrient agara final konsantrasyon %5 olacak şekilde sığır veya insan kanı ilave edilerek hazırlanmış olan kanlı agarda geliştirilen kolonilerin inkübasyon süresi sonunda etrafında şeffaf bir zon oluşturup oluşturmadıkları gözlenmiştir. Koloniler etrafında şeffaf zon oluşması pozitif olarak değerlendirilir [32].

2.2.3. Toplam Hücre Proteinlerinin Elde Edilmesi

Toplam hücre proteinlerinin elde edilebilmesi için kullandığımız yöntemde öncelikle - 80 °C' de muhafaza ettiğimiz stok kültürden aldığımız bakteri hücreleri nütrient agarda aktif hale getirilmiş ve daha sonra 100 ml nutrient broth içine yoğun bir şekilde aşılama yapılarak çalkalamalı etüvde 30 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra steril edilmiş santrifüj tüplerinde 10.000 rpm' de 10 dakika +4 °C' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldığında kalan pelet üzerine 8 mg lizozim (Applichem A 3711, 0010) ve 4 ml Tris-citrate tamponundan ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dak. bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler homojen süspansiyon haline getirilmek üzere hafifçe vortexlenmiştir. Sonikatör şişelerine aktarılan süspansiyonlar 3sn-3 sn periyotlarda buz üzerinde 6-7 dakika sonike edildikten sonra kırılma 40X objektifle gözlenmiştir. Elde edilen süspansiyon 15.000 rpm' de 20 dakika +4 °C'

de santrifüj edildikten sonra pelete dokunulmadan sadece süpernatant kısmı ependorf tüplerine paylaştırılmış ve etiketlenerek -20°C ' de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen protein örneklerinde protein miktarlarının tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır [40].

2.2.4. SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrez

SDS- Poliakrilamid jel elektrofrez için gerekli olan tüm malzeme hazırlandıktan sonra uygun ortamlarında saklanmıştır. Elektrofrez tankı kurulduktan sonra jelin hazırlanması işlemine geçilmiştir.

% 10' luk ayırma jelinin hazırlanması için gerekli olan H_2O , %30 akrilamid karışımı, 1.5 M Tris (pH 8.8), % 10 SDS, %10 AMPS ve TEMED materyaller kısmında belirtildiği miktarlarda steril uçlar ile temiz bir tüp içine hazırlanmış ve jel aygıtına karışım boşaltılmıştır. Dökülen jel üzerine, düz bir yüzey elde etmek ve dış ortamla teması keserek oksitlenmesini önlemek için, 4-5 damla bütanol ilave edilmiştir. Bütanol jelin donmasından sonra distile su ile temizlenmiş ve kurutma kağıdıyla su alınmıştır.

3 ml yükleme jelinin hazırlanması için gerekli olan H_2O , %30 akrilamid karışımı, 1 M Tris (pH 6.8), % 10 SDS, %10 AMPS ve TEMED materyal kısmında belirtildiği gerekli miktarlarda hazırlanmış ve donmuş olan ayırma jelinin üzerine dökülmüştür. Yükleme jeli henüz donmadan çukurlu tarak jele yerleştirilmiştir. Yükleme jeli donduktan sonra 1X yürütme tamponu ile elektrofrez tankı doldurulduktan sonra, tarak jeli bozmayacak şekilde dikkatlice çıkarılmıştır.

Jel çukurlarına yüklenmek üzere, protein miktarı 30 μl üzerine eklenen 2X jel yükleme tamponu miktarı 10 μl olacak şekilde toplamda 40 μl hacim elde edilerek hazırlanmıştır. Geniş aralıklı işaretleyici protein (Sigma M 4038) miktarı 5 μl olarak alınmış üzerine 10 μl 2X jel yükleme tamponu ve 25 μl distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

Protein örnekleri 2-3 dakika kaynayan su içinde bekletilmiştir. Kaynatılan örnekler ependorf tüplerinin dibinde toplamak üzere 10.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Hazırlanan protein örnekleri Hamilton şırınga vasıtasıyla donmuş yükleme jelinde tarak yardımıyla oluşturulan çukurlara aktarılmış ve 80 V' luk elektrik akımında elektroforeze tabi tutulmuştur. Boya ayırma jelinin başlangıç çizgisine geldiğinde güç kaynağı 120 V' a ayarlanmıştır. Jelde yürüyen boya jelin son hizasına ulaştığında elektroforeze son verilmiş ve jel elektroforez tankından çıkarılmıştır. Temiz bir kaba alınan jel, Coomassie Brilliant Blue jel boyası ile 2 saat boyanmıştır. Daha sonra yıkama tamponu içine konulan jel bir gece boyunca hafifçe çalkalanarak fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır.

2.2.5. Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için bakteri hücrelerine Alkali- Lizis yöntemi uygulanmıştır. Öncelikle nutrient agarda aktif hale getirilmiş olan bakteri hücreleri, daha sonra 100 ml nutrient broth içine tek koloniden ekim yapılarak çalkalamalı etüvde 150 devir/ dakika hızda 30 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda steril santrifuj tüplerinde 10.000 rpm' de +4 °C' de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmı atılarak pelet kısmı steril bir spatül yardımı ile ependorf tüplerine paylaştırılmıştır. Ependorf tüplerinde bulunan pelet üzerine 1 ml TE konulduktan sonra vorteks yardımıyla süspansiyon haline getirilmiş ve 10.000 rpm' de +4 °C' de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 100 µl Solüsyon I eklendikten sonra vortekste karıştırılarak süspansiyon haline getirilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda üzerine 200 µl Solüsyon II eklenmiş, alt üst edilerek karıştırılmış ve 10 dakika buzda bekletilmiştir. Üzerine 150 µl soğuk Solüsyon III ilave edilmiş, alt üst edilerek karıştırılmış ve 10 dakika buzda beklemeye alınmıştır. Süre sonunda 15.000 rpm hızda +4 °C' de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant temiz ependorf tüplerine alınmış ve miktarı belirlenmiştir. Süpernatant hacmine 2 hacim etanol eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 15.000 rpm' de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ependorf tüplerinde bulunan çökelti oda sıcaklığında tamamen kuruyuncaya kadar bekletilmiştir. Kuruyan çökelti üzerine 50 µl TE eklenerek ependorf tüpüne parmak ucuyla hafifçe vurularak süspansiyon haline getirilmiştir ve +4 °C' de muhafaza edilmiştir [37].

2.2.6. Agaroz jel Elektroforezi

150 ml, % 1' lik agaroz jelin hazırlanmasında kullanılacak jelin büyüklüğü dikkate alınarak 1.5 g tartılan agaroz TAE tampon içerisinde mikro dalga fırında kaynatılarak eritilmiştir. Elle tutulacak kadar sıcaklığa geldiğinde jel içerisine 0.5 µg/ ml etidyum bromür ilave edilmiştir. Jel kenarları sızdırmayacak şekilde düzeneğe dökülmüş ve plazmid örneklerini yükleyeceğimiz cepleri oluşturmak üzere tarak yerleştirilerek bu durumda donmak üzere beklenmiştir. Jelin donmasıyla düzenek elektroforez tankına geçirilmiş ve tarak dikkatlice jelden uzaklaştırılmıştır. Tarakların jelde oluşturduğu çukurlara 10 µl plazmid örneği ile 2 ml örnek yükleme tamponu (6X Mass Loading Dye Solution- FERMENTAS) karıştırılarak mikropipet yardımıyla yüklenmiştir. Jel 80 V akıma yaklaşık 45 dakika için tabi tutulmuştur. Sürenin sonunda jel bir transilüminatör üzerinde, UV ışığı altında incelenmiştir ve fotoğrafları çekilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. İncelenen Örneklerdeki Mikroorganizma Sayıları

3.1.1. Parça Et Örneklerindeki Mikroorganizma sayıları

Bu çalışmada 25 farklı gıda marketlerinden alınan 25 adet parça et örneği incelenmiştir. Parça et örnekleri E ile etiketlenmiş olup dolayısıyla elde edilen izolatlarda E ile simgelenmiştir. İncelenen parça et örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve *Bacillus cereus* hücre sayıları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. İncelenen örneklerindeki en düşük toplam bakteri sayısı E15 örneğinde gözlenmiş ve 1.05×10^5 cfu/g olarak belirlenmiştir. En yüksek sayım ise E23 örneğinde 9.25×10^7 cfu/g olarak bulunmuştur. Ortalama olarak toplam bakteri sayıları 10^4 , 10^5 , 10^6 , cfu/g olarak kaydedilmiştir.

İncelenen 25 parça et örneğinin 13 tanesinde (Örnek no E3, E4, E5, E6, E7, E8, E10, E11, E13, E16, E17, E18, E20, E25), %52' sinde *Bacillus cereus* olarak değerlendirilen kolonilere rastlanılmıştır. *Bacillus cereus* hücre sayıları 5 (Örnek no E7) ile 5×10^4 (Örnek no E11) cfu/g arasında belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Parça et örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı

Örnek	Toplam bakteri sayısı cfu/g	Toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı cfu/g
E1	1.58×10^4	-
E2	2.43×10^5	-
E3	5.5×10^4	1×10^2
E4	2.63×10^5	50
E5	1.08×10^4	2×10^2
E6	1.03×10^4	1×10^4
E7	3.5×10^5	5
E8	3.25×10^6	2×10^4
E9	2.2×10^6	-
E10	1.75×10^5	5×10^2
E11	4×10^6	5×10^4
E12	1.28×10^5	-
E13	1.3×10^6	8.5×10^2
E14	2×10^6	-
E15	1.05×10^5	-
E16	1.83×10^6	1.5×10^4
E17	5×10^5	15
E18	4.75×10^5	8.5×10^3
E19	2.45×10^5	-
E20	3×10^5	15
E21	2.93×10^4	-
E22	5×10^4	-
E23	9.25×10^7	-
E24	7×10^5	-
E25	1.9×10^5	5×10^3

3.1.2. Kıyma Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları

25 ayrı gıda marketinden toplanan 25 adet kıyma örneği K ile simgelenmiştir. Kıyma örneklerindeki toplam bakteri ve *Bacillus cereus* hücre sayıları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Kıyma örneklerindeki en düşük toplam bakteri sayısı K25 örneğinde gözlenmiş ve 3.78×10^4 cfu/g olarak belirlenmiştir. En yüksek toplam bakteri sayımı ise 4.25×10^8 cfu/g ile K22 örneğinde bulunmuştur. İncelenen diğer örneklerdeki toplam bakteri sayıları ise, ortalama 10^6 , 10^7 cfu/g arasında değişmiştir.

İncelenen 25 adet kıyma örneğinin 10 adedinde (K5, K7, K13, K15, K17, K18, K22, K23, K24, K25) yani %40' ında *Bacillus cereus* olarak tanımlanan kolonilere rastlanılmıştır. *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayıları 65 cfu/g (Örnek no K7) ile 4.41×10^4 cfu/g (Örnek no K17) arasında belirlenmiştir.

3.1.3. Tavuk Pirzola Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları

25 adet tavuk pirzola örnekleri 16 farklı gıda marketinden toplanarak Tp ile etiketlenmiştir. İncelenen tavuk pirzola örneklerindeki toplam bakteri ve *Bacillus cereus* sayıları Çizelge 3.3.'te verilmiştir. Tavuk pirzola örneklerindeki en düşük toplam bakteri sayısı Tp6 örneğinde 8.25×10^3 cfu/g olarak gözlenmiştir, en yüksek sayım ise 1.15×10^9 cfu/g ile Tp17 örneğinde bulunmuştur. Ancak ortalama olarak 10^4 , 10^6 , 10^7 cfu/g arasında sayımlar elde edilmiştir.

İncelenen 25 adet tavuk pirzola örneğinin yalnızca 2 adedinde yani %8'inde *Bacillus cereus* olarak tanımlanan kolonilere rastlanılmıştır. *Bacillus cereus* hücre sayılarının düşük olmasına karşılık toplam bakteri sayısının oldukça yüksek miktarlarda olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.2. Çiğ kıyma örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı

Örnek	Toplam bakteri sayısı cfu/g	Toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı cfu/g
K1	1.55×10^6	-
K2	9×10^4	-
K3	6.25×10^4	-
K4	1.58×10^7	-
K5	5.75×10^5	2×10^2
K6	2.63×10^5	-
K7	4.75×10^6	65
K8	7.25×10^7	-
K9	1×10^8	-
K10	1×10^7	-
K11	8.5×10^6	-
K12	7.5×10^6	-
K13	2.75×10^7	1.5×10^4
K14	3.75×10^6	-
K15	2.85×10^6	1×10^3
K16	4.75×10^7	-
K17	1.93×10^6	4.41×10^4
K18	4.5×10^5	2.6×10^3
K19	5×10^6	-
K20	8.5×10^7	-
K21	1.33×10^7	-
K22	4.25×10^8	1.35×10^4
K23	6.25×10^6	2.5×10^3
K24	1.85×10^7	3.5×10^4
K25	3.78×10^4	5×10^3

Çizelge 3.3. Çiğ tavuk pirzola örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı

Örnek	Toplam bakteri sayısı cfu/g	Toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı cfu/g
Tp1	9.25×10^4	-
Tp2	1.03×10^5	-
Tp3	3.75×10^4	-
Tp4	1.25×10^4	-
Tp5	1.38×10^4	-
Tp6	8.25×10^3	-
Tp7	7.25×10^6	-
Tp8	1.44×10^6	-
Tp9	1.58×10^4	-
Tp10	2.23×10^4	-
Tp11	8.5×10^3	-
Tp12	3.75×10^4	-
Tp13	8.25×10^7	-
Tp14	9×10^6	-
Tp15	1.6×10^6	-
Tp16	2.4×10^7	-
Tp17	1.15×10^9	-
Tp18	7.75×10^7	-
Tp19	4.75×10^6	-
Tp20	1.03×10^7	-
Tp21	8.25×10^6	-
Tp22	$6,75 \times 10^5$	-
Tp23	8.25×10^6	2.5×10^4
Tp24	4.25×10^7	6.5×10^4
Tp25	3×10^7	-

3.2.4. Et Sucuk Örneklerindeki Mikroorganizma Sayıları

25 adet et sucuk örneğinin incelendiği çalışmada et sucuk örnekleri Es ile simgelenmiştir. İncelenen et sucuk örneklerindeki toplam bakteri sayısı, *Bacillus cereus* hücre sayısı Çizelge 3.4.'te verilmiştir. İncelenen et sucuk örneklerindeki en düşük toplam bakteri sayısı 1.25×10^3 cfu/g ile Es4 örneğinden elde edilmiştir. En yüksek sayım ise 3.55×10^8 cfu/g ile Es21 örneğinde gözlenmiştir. Ortalama olarak 10^4 , 10^6 , 10^7 cfu/g arasında toplam bakteri sayımları elde edilmiştir.

İncelenen 25 et sucuk örneklerinde Es16 ve Es17 örnekleri olmak üzere 2 adedinde (%16' sında) *Bacillus cereus* olarak tanımlanan kolonilere rastlanılmıştır

3.1.5. Et Pastırma Örneklerinde Mikroorganizma Sayıları

25 adet et pastırma örneğinin incelendiği bu çalışmada, et pastırma örnekleri Ep ile belirtilmiştir. Et pastırma örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve *Bacillus cereus* hücre sayıları Çizelge 3.5.'te verilmiştir. Buna göre et pastırma örneklerindeki en düşük toplam bakteri sayısı Ep4 örneğinde 2.63×10^3 cfu/g olarak bulunmuşken en yüksek değeri Ep22 örneği 7.75×10^7 cfu/g olarak vermiştir. Ortalama olarak toplam bakteri sayısı ise 10^6 , 10^7 cfu/g arasında belirlenmiştir.

İncelenen bu 25 adet et pastırma örneğinde *Bacillus cereus* olarak tanımlanan kolonilere sahip et pastırma örneği Ep6 olarak gözlenmiştir.

Çizelge 3.4. Et sucuk örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı

Örnek	Toplam bakteri sayısı cfu/g	Toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı cfu/g
Es1	4.5×10^5	-
Es2	3×10^4	-
Es3	2.75×10^8	-
Es4	1.25×10^3	-
Es5	6.75×10^4	-
Es6	7×10^3	-
Es7	2.33×10^6	-
Es8	1.13×10^7	-
Es9	2.25×10^6	-
Es10	2.1×10^7	-
Es11	6.5×10^4	-
Es12	1.1×10^4	-
Es13	1.55×10^4	-
Es14	5.75×10^3	-
Es15	4.4×10^6	-
Es16	1.45×10^4	3×10^5
Es17	7.5×10^6	1.2×10^5
Es18	1.88×10^6	-
Es19	1.03×10^7	-
Es20	4.25×10^7	-
Es21	3.55×10^8	-
Es22	3.5×10^7	-
Es23	3.75×10^3	20
Es24	1.75×10^4	-
Es25	2.63×10^4	-

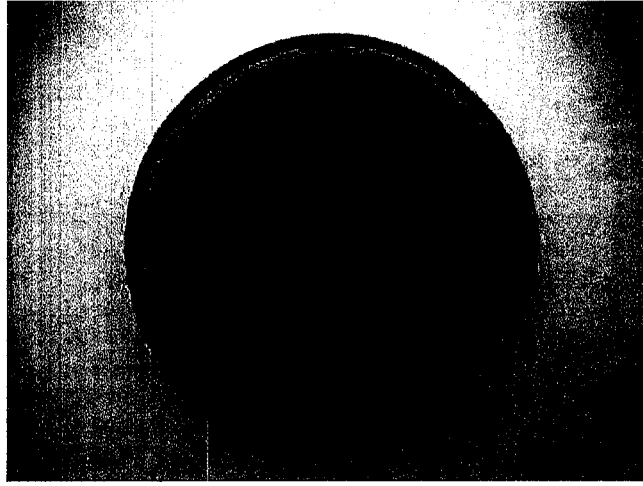
Çizelge 3.5. Et pastırma örneklerindeki toplam bakteri sayısı ve toplam *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı

Örnek	Toplam bakteri sayısı cfu/g	Toplam <i>Bacillus cereus</i> vejetatif hücre sayısı cfu/g
Ep1	2.1×10^7	-
Ep2	6.5×10^4	-
Ep3	2.75×10^6	-
Ep4	2.63×10^3	-
Ep5	2.2×10^6	-
Ep6	2.75×10^7	5×10^4
Ep7	6×10^7	-
Ep8	2.45×10^6	-
Ep9	1×10^5	-
Ep10	5.25×10^6	-
Ep11	6.5×10^5	-
Ep12	5.88×10^7	-
Ep13	1×10^6	-
Ep14	1.45×10^7	-
Ep15	1.75×10^7	-
Ep16	2×10^5	-
Ep17	7.5×10^4	-
Ep18	1.73×10^6	-
Ep19	2.7×10^7	-
Ep20	6.5×10^6	-
Ep21	5.25×10^6	-
Ep22	7.75×10^7	-
Ep23	1.68×10^7	-
Ep24	2.25×10^6	-
Ep25	4.5×10^5	-

3.2. Elde Edilen İzolatlara Uygulanan İdentifikasyon Testleri

Parça et, kıyma, tavuk pizola, sucuk ve pastırma örneklerinin incelenmesi sonucunda toplam 34 izolat saf kültür halinde elde edilmiştir. Bu izolatların 14 adedi parça et örneklerinden, 12 adedi kıyma örneklerinden, 3 adedi tavuk pizola örneklerinden, 4 adedi et sucuk örneklerinden ve 1 adedi de et pastırma örneğinden izole edilmiştir. Tüm izolatlar hem nutrient agar içerisinde hem de %15' lik gliserolde stok kültürleri hazırlanarak identifikasyon testlerinde kullanılmak üzere muhafaza edilmişlerdir.

Tüm izolatlara Gram boyama, hücre morfolojisi, glukozdan asit ve gaz üretimi, Voges-Proskauer reaksiyonu, nitrat redüksiyonu, hemoliz ve katalaz testleri uygulanmıştır. Standart kültür *Bacillus cereus* NRRL B 3711' in Şekil 3.1' de MYP agarda görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.1 Standart *Bacillus cereus* NRRL B 3711' in MYP agarda görünümü

3.2.1. Gram Boyama ve Hücre Morfolojisi

İzolatlar Gram boyama işleminden sonra mikroskopta incelendiğinde tüm izolatlar mor renkte gözlenmiş fakat hücre morfolojisi açısından 33 adet izolatın basil, 1 adet izolatın ise kok şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Buna göre tüm izolatlar Gram (+) olarak değerlendirilirken, hücre morfolojisi açısından 33 izolat basil, 1 izolat ise kok olarak değerlendirilmiştir. Test sonuçları Çizelge 3.6' da verilmiştir.

3.2.2. Glukozdan Asit ve Gaz Oluşturma

Tüm izolatların glukoz broth besiyerinin kırmızı rengini sarıya dönüştürdüğü görülmüştür. Glukoz broth besiyeri içindeki durham tüplerinde ise gaz oluşmamıştır. Tüm izolatlar glukozdan asit oluşturma (+), gaz oluşturma (-) olarak değerlendirilmiştir. Pozitif ve negatif test sonuçları Çizelge 3.6' da verilmiştir.

3.2.3. Hemoliz Testi

%5 steril kan içeren nutrient agar besiyerine tüm izolatlardan ekim yapılmış. 30 °C' de 24 saat inkübasyon süresi sonunda koloniler etrafında şeffaf bir zon oluşup oluşmadığı değerlendirilmeye alınmıştır. Tüm izolattan 22 adedinin hemoliz yapmış olduğu gözlenirken, 12 adet izolatın etrafında şeffaf bir zon oluşmadığı belirlenmiştir. Test sonuçları Çizelge 3.6' da verilmiştir.

3.2.4. Nitrat Redüksiyonu

10 ml nitrat broth içeren tüpler içerisine inoküle edilen izolatlar 30 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 3 ml' lik kültürler üzerine 250 µl sülfanilik asit çözeltisi ve 250 µl α- naftilamin solüsyonu damlatılmış ve besiyerinde kırmızı kahverengi rengin oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. 34 izolatın 5 adedinin nitratı-nitrite indirgeyemediği, 29

adedinin ise pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Pozitif veya negatif test sonuçları Çizelge 3.6' da verilmiştir.

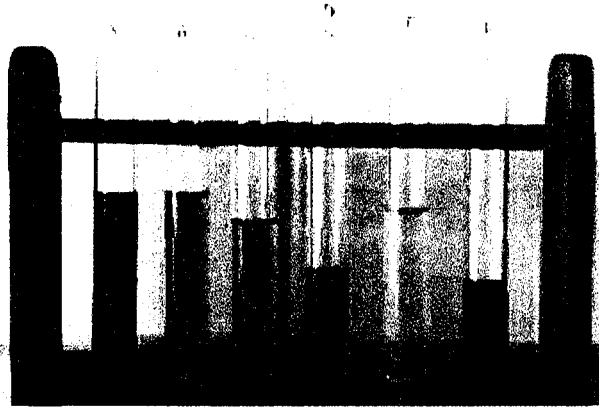
3.2.5. Voges- Proskauer Reaksiyonu

Tüm izolatlar 10 ml' lik MR-VP broth içeren tüplere inoküle edilmiş ve 30 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda kültürlerin her birinden 3 ml alınarak steril tüplere aktarılmış üzerlerine 1.8 ml α -naftol solüsyonu ve 0.6 ml %40' lık KOH çözeltisi damlatılarak besiyerinde pembe renk oluşumu pozitif sonuç olarak gözlenmiştir. Test sonuçlarına göre (Çizelge 3.6) izolatların 4 adedi Voges-Proskauer reaksiyonunda negatif olarak değerlendirilirken, geriye kalan 30 adet izolat pozitif olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Katalaz Testi

Nutrient agarda geliştirilmiş olan tüm izolatların kolonileri üzerine %3' lük H₂O₂ çözeltisi damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığı gözlenmiştir. Test sonuçlarına göre katalaz testi için 34 izolatın tümünde gaz çıkışı gözlenmiş ve Çizelge 3.6' da katalaz pozitif olarak kaydedilmiştir.

Sonuçta, Gram (+) basil, glukozdan asit oluştururken gaz oluşturmayan, β -hemolizi gerçekleştiren, nitratı- nitrite indirgeyen, Voges-Proskauer reaksiyonunda pozitif sonuç veren, katalaz pozitif olan izolatlar *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır. Yapılan identifikasyon testleri sonucunda; çiğ halde bulunan et ve et ürünü örneklerinden elde edilmiş 34 izolatın 19 adedi *Bacillus cereus* olarak tanımlanırken 15 adedi tanımlanamamıştır. Uygulanan tüm identifikasyon test sonuçları Çizelge 3.6.'da verilmiştir.



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

- A – Kontrol Glikozdan Asit ve Gaz Oluşumu
- B – Glukozdan Asit (+), Gaz (-)
- C – Kontrol Nitrat Redüksiyonu
- D – Nitrat Redüksiyonu (+)
- E – Kontrol Voges Proskauer Reaksiyonu
- F – Voges Proskauer Reaksiyonu (+)

A,B,C,D,E,F - *Bacillus cereus* (NRRL B 3711)

Çizelge 3.6. İdentifikasyon test sonuçları

İzolat	Gram Reaksiyonu ve morfoloji	Glukozdan Asit	Glukozdan Gaz	β Hemoliz	Nitrat Redüksiyonu	Voges Proskauer	Katalaz	Muhtemel identifikasyon
B. cereus NRRL B3711	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
E3	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	+	(-)
E4	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	+	(-)
E5	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
E6	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
E7	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	+	(-)
E8	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
E10	Gram (+) basil	+	-	+	+	-	+	(-)
E11	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
E13	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
E16	Gram (+) basil	+	-	+	-	+	+	(-)
E17	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
E18	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	+	(-)
E20	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
E25	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	+	(-)
K5	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
K7	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>

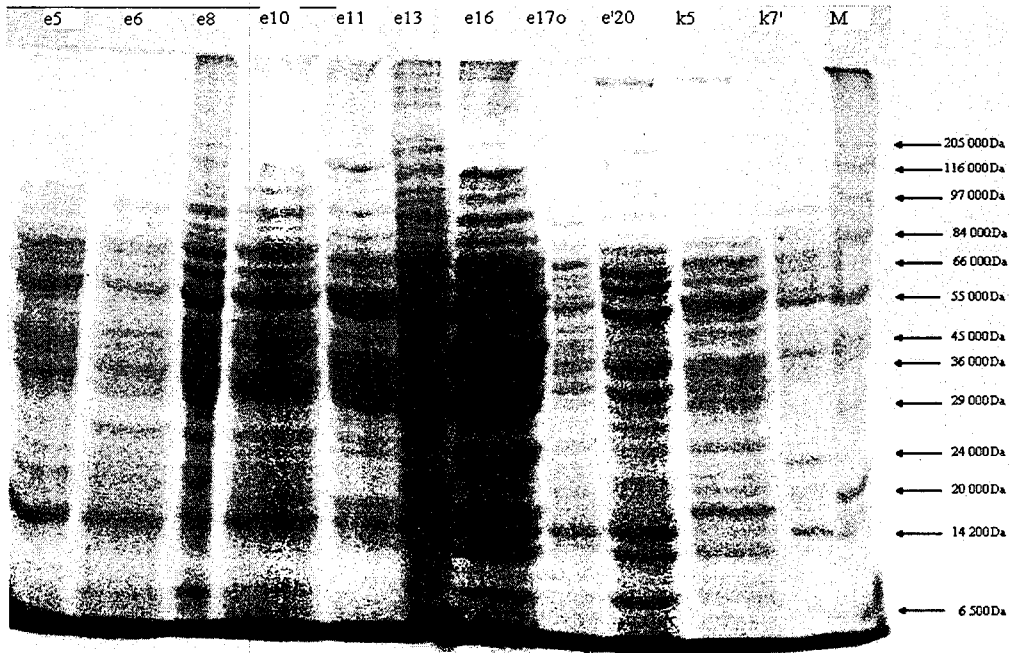
Çizelge 3.6. (Devam) İdentifikasyon test sonuçları

İzolat	Gram Reaksiyonu ve morfoloji	Glukozdan Asit	Glukozdan Gaz	β Hemoliz	Nitrat Redüksiyonu	Voges Proskauer	Katalaz	Muhtemel identifikasyon
K13	Gram (+) basil	+	-	-	-	+	+	(-)
K15	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
K17	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	+	(-)
K18	Gram (+) basil	+	-	-	-	+	+	(-)
K18 ₂	Gram (+) basil	+	-	-	-	+	+	(-)
K22	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
K23	Gram (+) basil	+	-	-	+	+	+	(-)
K24	Gram (+) basil	+	-	+	+	-	+	(-)
K25	Gram (+) basil	+	-	-	-	-	+	(-)
Tp23	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
Tp24	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
Tp24 ₁	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
Es16	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
Es16 ₁	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
Es17	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
Es17 ₁	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
Es23	Gram (+) kok	-	+	-	+	-	+	(-)
Ep6	Gram (+) basil	+	-	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>

3.3 Toplam Hücre Proteinlerinin Eldesi ve SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

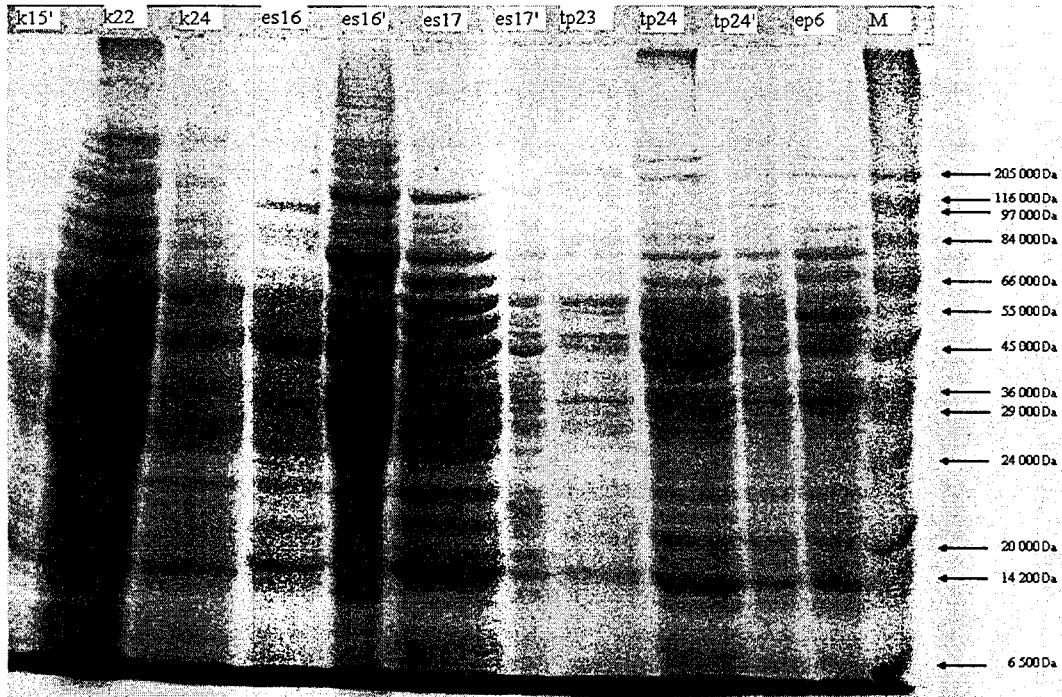
Bacillus cereus izolatlarının protein ekstraktları Viola ve ark. [35] çalışmalarında uyguladıkları yöntemle göre kullanılıp Tris- sitrat tamponu içinde 3 sn kırma- 3sn soğutma periyotlarda buz üzerinde 6-7 dakika sonikasyona tabi tutularak hazırlanmıştır.

Bizim çalışmamızdan 9 tanesi parça et örneği (e5, e6, e8, e10, e11, e13, e16, e17o, e¹²⁰), 5 tanesi kıyma örneği (k5, k¹⁷, k15¹, k22, k24), 4 tanesi et sucuk örneği (es16, es16¹, es17, es17¹), 3 tanesi tavuk pirzola örneği (tp23, tp24, tp24¹) ve 1 tanesi de et pastırma örneği (ep6) olmak üzere, toplamda 22 izolattan elde edilen strainlere ait protein örnekleri SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrezine tabi tutulmuştur. *Bacillus cereus* olarak tanımladığımız 11 adet izolatın protein örneklerine ait (e5, e6, e8, e10, e11, e13, e16, e17o, e¹²⁰, k5, k¹⁷) bantlar Şekil 3.3' de verilmiştir.



Şekil 3.3. *Bacillus cereus* izolatlarının toplam hücre proteinlerine ait SDS-PAGE profilleri

11 izolatin protein örneklerine ait (k15¹, k22, k24, es16, es16¹, es17, es17¹, tp23, tp24, tp24¹, ep6) bantlar ise Şekil 3.4' de verilmiştir.



Şekil 3.4. *Bacillus cereus* izolatlarından elde edilen protein örneklerinin SDS-PAGE profilleri

Her iki jel fotoğrafında da M olarak adlandırılan en son çukurda gözlenen protein işaretleyicisi (Sigma M 4038) molekül ağırlıkları belirlenmiş olan 13 farklı molekül ağırlığında ki (en üstten başlayarak 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) bantları oluşturduğu gözlenmiştir.

Şekil 3.3' de örnekleri koyu renkli bantlar ve molekül ağırlıkları açısından karşılaştırdığımızda örneklerden e5 çukurunda bulunan ve e6 çukurda bulunan örnekleri kendi arasında; e8 çukurda bulunan bantlar ile e10, e11, e13, e16 ve e¹20 çukurlarında elde edilen proteinlerin de kendi aralarında benzer profiller oluşturduğu gözlenmiştir. Et örneklerinin benzer molekül ağırlıklarında oluşturduğu koyu bantlar açısından farklı profil çizen örnek sadece e17o çukurda yer alan örnektir (Şekil 3.4.).

Şekil 3.3' de k5 ve k7¹ çukurlarında, Şekil 3.4.' de ise k15¹, k22, k24 çukurlarında kıyma örneklerinden elde ettiğimiz izolatlarının toplam hücre protein profilleri oluşturulmuştur. Örneklerden Şekil 3.4' de k22 çukurunda bulunan protein profili ile k24 çukurunda bulunan protein profilindeki benzerliğin diğer kıyma örneklerinden elde edilen profillere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

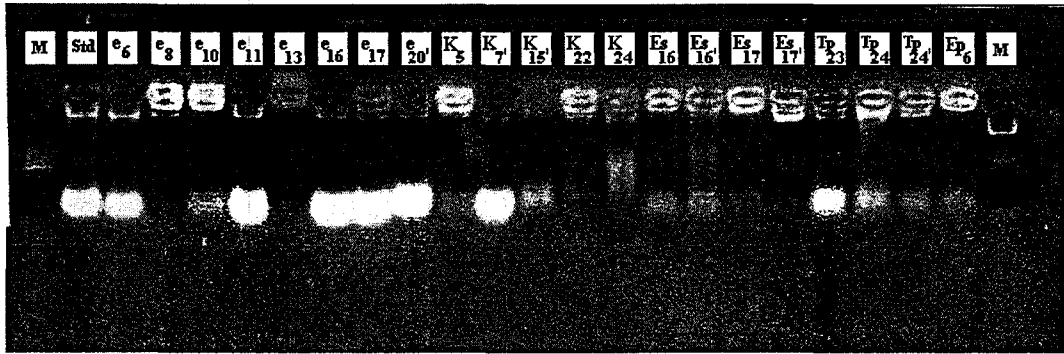
Şekil 3.4.' de es16 çukurunda yer alan protein profili ile es16¹ çukurda yer alan protein profili aynı sucuk örneğine ait izolatlardan oluşmuş toplam hücre protein profilleridir Aynı şekilde es17 çukurunda bulunan ile es17¹ çukurda bulunan proteinler aynı örneğe ait profillerden oluşmuştur. Bu örneklerden elde edilen ve *Bacillus cereus* olarak tanımlanan izolatlardan elde edilen proteinlerin oluşturduğu tüm bantlar oldukça benzer molekül ağırlıklarında profiller oluşturmuştur.

Aynı tavuk pirzola örneğinden izole edilmiş olan tp24 ve tp24¹ örneklerine ait olan toplam hücre proteinlerinin oluşturduğu bantlar ile ep6' dan elde edilen toplam hücre protein profili aynı molekül ağırlıklarında bantlaşma göstermiştir.

Her iki şekilde de M olarak adlandırılan en son çukurda gözlenen protein işaretleyicisinin oluşturduğu 14.200 Da ağırlığındaki bandı yalnız k5 çukuruna yüklenen izolat hariç tüm et ve et ürünlerinden elde edilen izolatların oluşturduğu gözlenmiştir.

3.4. Plazmid Eldesi ve Agaroz Jel Elektrofrezisi

Et ve et ürünlerinden elde edilen ve *Bacillus cereus* olarak tanımlanan izolatlardan plazmid eldesi için Alkali- Lisis yöntemi kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır [37]. Örneklerden elde edilen plazmid izolatları % 0.1' lik Agaroz Jel Elektrofrezine tabi tutulmuştur. İlk jelde plazmid örneklerinin negatif sonuç vermesi nedeniyle örnekler yeniden hazırlanmış ve 2. kez yürütülmüştür. 2. Jelde Fermentas Gene Ruler (1 kb DNA Ladder) marker kullanılmıştır.

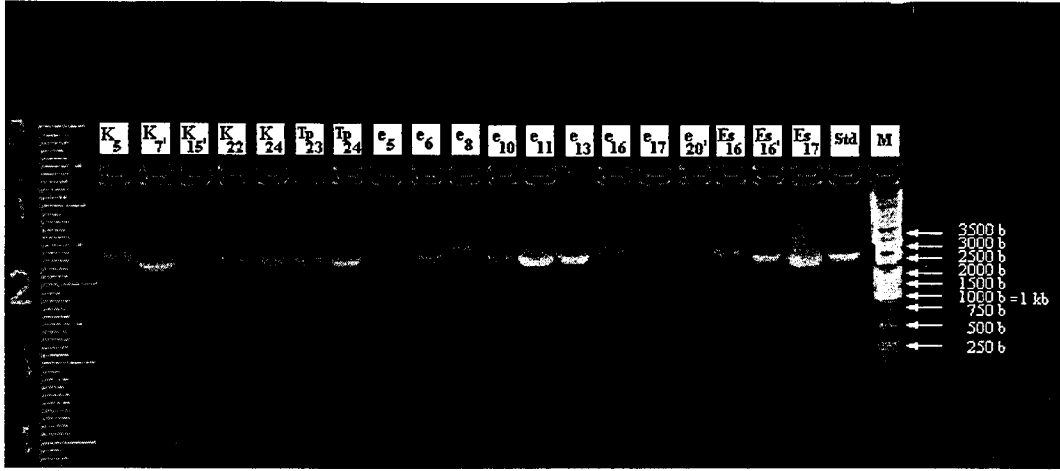


Şekil 3.5. *Bacillus cereus* izolatlarından elde edilmiş plazmidlerin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile incelenmesi

Şekil 3.5.' te ilk olarak yürütülen jelde standart *Bacillus cereus* NRRL B 3711 başta Std çukurunda olmak üzere ve e6, e11, e16, e17, e¹20, k7¹ örneklerinden elde edilen plazmidlerin yoğun olarak jelde bulunduğu gözlenmiştir. Ancak bu jelde e8 ve e13 örneklerinden plazmid elde edilemediği tespit edilmiştir.

Şekil 3.6' da sırasıyla k5, k¹7, k22, k24, tp23, tp24, e6, e8, ee10, e11, e13, e16, e20¹, es16, es16¹, es17 izolatlarından ve standart *Bacillus cereus* NRRL B 3711' den elde edilen plazmidlerin bant oluşturdukları gözlenmiştir. e5 ve e17 izolatların da bant gözlenmemiştir

Her iki jelde de plazmid gözlemediğimiz tek örnek e5 izolatıdır. Bu durumda örneklerin %95'i plazmide sahiptir.



Şekil 3.6. *Bacillus cereus* izolatlarından elde edilmiş plazmidlerin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi

Örneklerden izole edilerek Agaroz Jel Elektroforezi'nde oluşturulan plazmid bantları ile işaretleyici bantları karşılaştırıldığında e8 izolatının plazmid bandı hariç diğer bütün izolatların 2,5- 3 kb arasında plazmid bandına sahip oldukları tespit edilmiştir. e8 izolatının plazmid büyüklüğü diğer izolatlardan farklı olarak 3 kb düzeyinde band oluşturduğu gözlenmiştir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bacillus cereus genellikle saprofit olarak toprak, su, hava ve bitkilerde bulunur. Ayrıca çiğ haldeki ve işlenme sürecindeki gıdalara kolaylıkla bulaşabilen ve gıda zehirlenmelerine neden olan patojen bir mikroorganizmadır. *Bacillus cereus* gıda zehirlenmesinde aracı gıdalar olarak; genellikle kuru gıda maddeleri, baharatlar, baklagiller, et, kümes hayvanları, süt ve süt ürünleri, pişmiş ve uygun olmayan koşullarda saklanan gıdalarda bulunur [41]. *Bacillus cereus*' un hastalık oluşturabilmesi için şüpheli gıda içinde 10^5 cfu/g değerinde olması gerekliliği bildirilmiştir (Lattuada & McClain, 1998) [15,21].

Bacillus cereus, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* spp. gibi bakterilerin gıdalar da bulunmasının hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Gıda zehirlenmelerinde istatistiki bilgilerin sağlıklı olmamasına karşın gıda enfeksiyonlarında ve intoksikasyonlarında istatistikler *Staphylococcus aureus*' un sebep olduğu intoksikasyonların *Salmonella*' dan daha fazla olduğu belirtilmektedir. Yurdumuzda da gıda zehirlenmesine neden olan organizmalar genellikle *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Bacillus cereus* olarak bilinmektedir [3]. Çeşitli dünya ülkelerinde artan önemine ve neden olduğu gıda zehirlenmelerinin yaygınlığına paralel olarak pek çok gıda maddesi *Bacillus cereus*' un mevcudiyeti yönünden araştırılmaktadır. *Bacillus cereus*' un çeşitli gıdalarda varlığı üzerine ülkemizde yapılmış araştırma sayısı oldukça azdır [12]. Bizim çalışmamızda Eskişehir' de satışa sunulan çiğ haldeki et ve et ürünlerinde *Bacillus cereus* varlığı araştırılmış ve bu boşluğun kısmen doldurulması hedeflenmiştir.

Bacillus cereus' un izolasyonu ve sayımı için iki besiyeri önerilmektedir. Bunlar; MYP (Mannitol-EggYolk- Polymyxin) (Mossel ve ark. 1967) agar ve PEMPA (Polymyxin- EggYolk-Mannitol Bromothymol Blue Agar) (Holbrook ve Anderson, 1980) besiyerleridir. Bu iki besiyerinde organizmanın seçici özelliği olarak, polimiksine direnci gözlenmektedir. *Bacillus cereus* fosfolipaz C (=lesitinaz) oluşturmaktadır. Bu özelliğinden yararlanılarak izolasyon besiyerine yumurta sarısı katılmak suretiyle lesitinaz üretimi sonucunda gelişen koloniler

etrafında bir presipitasyon halkası oluşması ve mannitolün karbon kaynağı olarak kullanılmaması gibi karakteristik özellikleri açısından her iki besiyeride diagnostik besiyerleri olarak geliştirilmiştir [1,9,22]. MYP ve PEMPA gibi kullanılan seçici besiyerlerinin dezavantajı diğer mikroorganizmaların gelişiminin tanımlanmak istenen *Bacillus cereus*' un hiçbir besiyeri modeli tarafından tamamen inhibe edilememesidir. Bu seçici besiyerleri üzerinde gelişen *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* benzer şekilde egg-yolk reaksiyonuna pozitif sonuç veren diğer *Bacillus spp.*' dir [21,23]. Diğer taraftan *Bacillus cereus*' un lesitinaz oluşturmeyen suşlarında bulunmaktadır [1].Goepfert ve ark. 1972' de, Harmon ve ark. 1992 yılında MYP agarın en büyük dezavantajı olarak, ayrı koloniler etrafında oluşan zonların birleşmesinin koloni sayımında zorluğa neden olduğunu bildirmişlerdir [23]. PEMPA besiyerinde sodyum pürivat ilavesi rhizoid koloni oluşumunu azaltır, fakat egg-yolk reaksiyonunu geliştirmesine karşın besiyerinde *Bacillus cereus* dışındaki mikroorganizmalarda bazen yoğun şekilde ürediğinden şüpheli kolonilerin saflaştırılmalarını zorlaştırır [24,25]. Dolayısıyla örnekler içinde aranılan organizmanın saflaştırılması öncelik gerektiğinden bizim çalışmamızda *Bacillus cereus* izolasyonu için MYP agar kullanılmıştır.

Bu çalışmada Eskişehir' in çeşitli semtlerindeki marketlerde ve gıda pazarlarında tüketime sunulan parça et, kıyma, tavuk pırzola, et sucuk ve et pastırma örneklerinin her birinden 25' er adet toplanarak toplam bakteri ve *Bacillus cereus* vejetatif hücre varlığı yönünden incelenmiştir. Toplam 125 et ve et ürünlerinden oluşan örneklerin 22 tanesi *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bulunmuştur. Gıdalar içinde bulunan *Bacillus cereus* sayısı, örneklerin % 27.2' sinde gramında $>10^2$ cfu/g değerinden daha az, %22.7' sinde ortalama 10^2 cfu/g değerinde, %50' sinde ortalama 10^3 ve ortalama 10^4 cfu/g düzeylerinde, % 9' unda 10^5 cfu/g düzeyini aşan değerlerde *Bacillus cereus* içerdiği tespit edilmiştir. Test edilen tüm örnekler içinden Es16- Es17 sucuk örneklerinin gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde *Bacillus cereus* içerdiği gözlenmiştir.

İncelenen parça et örneklerinin toplam bakteri sayıları ortalama 10^4 , 10^5 , 10^6 , cfu/ml olarak kaydedilmiştir. Tüm parça et örneklerinde %24' ü gramda ortalama 10^4 düzeyinde, %44' ü gramda ortalama 10^5 cfu/g düzeyinde, %28' i ise

$>10^5$ cfu/g üzerindeki değerlerde toplam bakteri sayısı içerdiği gözlenmiştir. Parça et örneklerinin *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı bakımından incelenmesi sonucunda 25 adet örneğin %56' sında (14 tanesinde) *Bacillus cereus* izole edilmiştir. *Bacillus cereus* izole edilen 14 adet örneğin %28.5' inde (4 tanesinde) *Bacillus cereus* varlığı belirlenmiş, ancak elde edilen *Bacillus cereus* sayısı oldukça düşük bulunmuştur. Tüm parça et örneklerinin %16' sı gramda $>10^2$ cfu/g değerinin altında, %20' i gramda ortalama 10^2 - 10^4 cfu/g arasındaki düzeylerde, %16' sı ortalama 10^4 cfu/g düzeyinde *Bacillus cereus* içerdiği gözlenmiştir (Çizelge 3.1.). Bu değerler *Bacillus cereus* hücre sayısının gıda zehirlenmesi oluşturabilecek durumda olmadığını göstermektedir. Çünkü *Bacillus cereus*'un gıda zehirlenmesi oluşturabilmesi için $>10^5$ cfu/ml düzeyinde bulunması gerekmektedir.

Çiğ kıyma örneklerinin tümünde yüksek sayılarda toplam bakteri sayısı elde edilmiştir. Örneklerde bulunan en yüksek toplam bakteri sayısı 4.25×10^8 cfu/g düzeyinde bulunmuştur. Çiğ kıyma örneklerinde toplam bakteri sayısının parça et örneklerine oranla yüksek düzeyde bulunması yüzeyi arttırılan etin işlenmesi sırasında kontaminasyonun da artmasına neden olduğu düşünülmüştür. 25 tane çiğ kıyma örneğinin 10 tanesinden (%40' ından) *Bacillus cereus* izole edilmiştir. Örneklerden elde edilen izolatların %20' sinde (5 tanesinde) gramda ortalama 10^3 cfu/g değerinde, %16' sında (4 tanesinde) ortalama 10^4 cfu/g düzeyinde, sadece 1 örnekte (%4) ise oldukça düşük sayıda *Bacillus cereus* içerdiği gözlenmiştir. Ayrıca, incelenen kıyma örneklerinin *Bacillus cereus* sayısının gıda zehirlenmesi oluşturabilecek düzeyde olmadığı da belirlenmiştir (Çizelge 3.2.).

Tavuk pirzola örneklerinin incelenmesi sonucu örneklerden ortalama olarak 10^4 , 10^6 , 10^7 cfu/g arasında toplam bakteri sayımları elde edilmiştir. Toplam hücre sayılarında en yüksek değer 1.15×10^9 cfu/g olarak bulunmuştur ve bu değer aynı zamanda tüm incelenen örneklerde bulunan en yüksek sayısal değerdir. İncelenen çiğ tavuk pirzola örneklerinde yalnız 2 tanesinde (%8) *Bacillus cereus* kontaminasyonunun olduğu gözlenmiştir. Kontamine olmuş örnek sayısı az olmasına karşın izole edilen *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı gramda $>10^5$ cfu/g değerlerinde bulunmuştur (Çizelge 3.3). Elde edilen bu değerler tavuk

pirzola örneklerinde bulunan *Bacillus cereus* sayısının gıda zehirlenmesi oluşturabilecek düzeyde olmadığı saptanmıştır.

İncelemeye aldığımız 25 tane et sucuk örneklerinde toplam bakteri sayısı 10^3 - 10^9 cfu/g arasında değerler almıştır. Örneklerin %48' inde toplam bakteri sayısı $>10^5$ cfu/g değerinin altında bulunmuştur. Et sucuk örneklerinin % 12' si *Bacillus cereus* ile kontamine olarak kaydedilmiştir. İzole edilen örneklerden Es23 yalnızca 20 cfu/g değerinde *Bacillus cereus* sayısı içerdiği saptanmıştır. İzole edilen *Bacillus cereus* hücre sayısının 2 örnekte gramda ortalama $>10^5$ değerini aşmış olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla gıda zehirlenmesi oluşturabilecek düzeyde *Bacillus cereus* sayısı içerdiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.4.).

İncelenen 25 tane et pastırma örneğinden izole edilen toplam bakteri sayısı oldukça yüksek bulunmuştur. Ortalama olarak toplam bakteri sayısının 106, 107 cfu/g arasında belirlenmiştir. Buna karşın sadece 1 örnek (%4 oranında) *Bacillus cereus* ile kontamine halde bulunmuştur. *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısı 5×10^4 cfu/g değerinin aldığı saptanmıştır (Çizelge 3.5.). Bu durumda gösteriyor ki örneklerde *Bacillus cereus* bulunma oranı oldukça düşüktür. Ancak belirlenen örneklerde *Bacillus cereus* hücre sayısı gıda zehirlenmesi oluşturacak derecedeki $>10^5$ cfu/g değerine yakındır.

Konuma ve ark. [10] incelemeye aldıkları çiğ et, et ürünleri ve et katkı maddelerini içeren 1963 örnekte, et ürünlerinden % 18.3 oranında, çiğ etten ise % 6.6 oranında *Bacillus cereus* izole edilmiş ve bu ürünlerin kontaminasyon düzeyleri genelde gramda 10^2 cfu/g' dan daha düşük bulunmuştur. Diğer taraftan et katkı maddelerinde % 39.1 oranında *Bacillus cereus* izole edilmiştir. Kontaminasyon düzeyleri genellikle gramda $10^2 - 10^4$ cfu/g arasında bulunurken özellikle hayvansal proteinlerde ve baharatta gramda 10^4 cfu/g değerini aşan düzeylerde *Bacillus cereus* kontaminasyonuna rastladıklarını bildirmişlerdir. Bu sonuçlardan hareketle et ürünlerinde *Bacillus cereus* kontaminasyonunun kaynağının kontamine et katkı maddeleri olduğunu ortaya koymuşlardır.

Nel ve ark. [15] mezbahalarda kesimi yapılmış kırmızı etlerle yapmış oldukları çalışmada, izole edilen *Bacillus cereus* sayısını ortalama 8.32×10^3 cfu/g değerinde kaydetmişlerdir. Güney Afrika Sağlık Departmanı' nın çiğ etler içinde *Bacillus cereus*' un maksimum bulunma limitinin gramda 10^3 cfu/g

değerinde olması gerekliliği bildirilmiştir. Ayrıca araştırmalarında elde ettikleri sonuçlar karşılaştırıldığında *Bacillus cereus*' un muhtemel kontaminasyon kaynaklarının hayvan derisi ve toprak olduğu belirtilmiştir.

Ternstöm ve Molin [11] çiğ halde tavuk sığır ve domuz etlerinde 45' er örnekli gruplardan domuz etinde %7, sığır etinde % 11 oranında *Bacillus cereus* izole edildiğini, ancak tavuk etinden *Bacillus cereus* izole edilmediği bildirilmiştir.

Mısır' da, et ürünleriyle yapılan bir araştırmada analize alınan 150 örneğin 34' ünün (% 22.6) *Bacillus cereus* içerdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada 100 kıyma örneğinin 18' i (% 18), 25 sucuk örneğinin 7' si (% 28) ve 25 pastırma örneğinin de 9' u (% 36) *Bacillus cereus* ile kontamine halde bulunmuştur [12].

Kavurma ve kanatlı eti tüketime bağlı olarak *Bacillus cereus*' un gıda zehirlenmelerine sebep olduğu da bildirilmiştir. Sooltan ve ark. taze veya dondurulmuş, çiğ yada pişirilmiş toplam 102 kanatlı et ürünü örneğinden % 6.9 oranında *Bacillus cereus* izole etmişlerdir. Sharma ve ark. Hindistan'da yaptıkları bir araştırmada tavuk sosis, tavuk salam, kokteyl sosis, şiş kebab ve domuz salamı örneklerinde gramda $2.1 \times 10^5 - 4.7 \times 10^5$ arasında *Bacillus cereus* bulmuşlardır [12].

Vazgeçer ve ark. [13] 72 adet pişirilmiş tavuk döner örneklerin % 48' inde örnekler içindeki sayıları 10^2 cfu/g dan az olmak üzere *Bacillus cereus* kontaminasyonu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca pişirilmiş tavuk döner örneklerinin %17' sinde *Bacillus cereus* sayıları $10^2 - 10^3$ cfu/g arasında bulunurken, % 35' inde $10^3 - 10^4$ cfu/g olarak bildirilmiştir. Çalışmalarında tavuk döner içine tavuk derisinin de ilave edilmesinin patojen mikroorganizmalar açısından büyük risk oluşturduğunu ve gıdanın uygun koşullarda üretimi gerçekleştirilirse mikrobiyolojik açıdan önemli risk teşkil etmeyeceğini bildirmişlerdir.

Fang ve ark. [14] 18°C ' de saklanan RTE (tüketime hazır halde bulunan) 164 tane gıda ürünleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada, daha çok et ve jambon içerikli olan RTE gıda örneklerinin % 62.5' i *Bacillus cereus* ile kontamine halde bulunmuştur. Ayrıca deniz yosunu içine sarılmış pirinç topraklarında % 56' sının, soğuk şehriye örneklerinin %66.7' sinde *Bacillus cereus* varlığı belirlenmiştir. Çalışmalarında 18°C ' de saklanan RTE gıdaların

mikrobiyolojik kalitelerinin sağlanması amacıyla, imalatında kullanılan saklama kutuların çok dikkat gerektirdiği ve bu tip gıdaların üretiminde ısı kontrolünün çok önemli olduğu sonucuna varmışlardır.

Nortje ve ark. [16] ezilmiş sığır eti, ızgara tavuk, işlenmiş et çeşitleri olan sucuk, salam, jambon örnekleri *Bacillus cereus* kontaminasyonu açısından araştırılmıştır. Teste alınan toplam 51 et örneğinin 1 ızgara tavuk örneği, 3 salam örneği (% 5.9), 5 sucuk örneği (% 9.8) *Bacillus cereus* ile kontamine bulunurken; ezilmiş sığır eti ve jambonda *Bacillus cereus* kontaminasyonu saptanmamıştır. İşlenmiş et ürünü örneklerinde ki *Bacillus cereus* sayıları ise sucuk örneklerinde 1×10^4 - 5×10^8 cfu/g arasında bulunurken, salam örneklerindeki seviyesi 6.3×10^4 - 1×10^8 cfu/g olarak tespit edilmiştir. Çalışmalarında jambonun ısıl işlem öncesinde tuzlanması bakteriyel aktivitenin gecikmesine neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmaları sonucunda *Bacillus cereus*' un taze gıdalardan daha çok işlenmiş gıdalarda varlığının arttığını belirtmişlerdir. Bunun nedenini, sporlu bir bakteri olan *Bacillus cereus*' un işlem görmesiyle oluşan sporlarının işlem sonrasında vejetatif hücre haline gelmesine bağlamışlardır.

Schlegelova ve ark. [17] toplam 161 gıda ham madde örneğinde *Bacillus cereus* kontaminasyonu araştırılmıştır. Analiz edilen et ürünü örneklerinin 31' i (% 28) ve kuru gıda örneklerinin 66' sı (% 31), kaymaklı süt ürünlerinden ise yalnız 1 tanesi *Bacillus cereus* ile kontamine olarak bulunmuştur. Teknolojik yöntemlerle ısıl işlemden geçirilen çok yağlı süt örneklerinden %63' ünün, yine ısıl işlem uygulanan et ürünlerinden %48' inin önemli ölçüde *Bacillus cereus* ile kontamine halde bulunmuştur. Özellikle ısıl işlem görmüş et örneklerinin ısıl işlem görmemiş fermente edilmiş ürünlerden daha fazla *Bacillus cereus* ile kontamine halde bulunduğunu bildirmişlerdir. Gıda maddelerinde *Bacillus cereus*' un çok sık rastlanması nedenini gıdalarda yağ moleküllerinin bulunmasına ki bu mikroorganizmanın yağ molekülleri arasında saklanması ve mide pH' sından etkilenmemesine neden olur, ve /veya bu ürünlerin risk grubu olmasına neden olacak ısıl işlemlerin uygulanmasına bağlamışlardır.

Bizim çalışmamızda incelenen 125 adet et ve et ürünlerinden oluşan örneklerden elde ettiğimiz *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayılarında gıda zehirlenmesine risk oluşturabilecek düzeyde $>10^5$ cfu/g değerini aşan 2 adet et

sucuk örneği gözlenmiştir. Fermente gıdalarda biri olan taze sucuk hamurunun mikroflorası içerisinde *Bacillus cereus* normal koşullarda bulunmamaktadır [3]. Fakat doğada çok geniş alana yayılmış olan *Bacillus cereus* sucuk örneklerinde hammadde, üretim, olgunlaşma ve saklama koşullarının uygun olmadığı durumlarda kontamine olarak bulunabilir. *Bacillus cereus* varlığı açısından incelemeye aldığımız örneklerin %7.2' sinde $>10^3$ cfu/g değerinin altında *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısına rastlanırken, %92' sinde ise sayının gramda ortalama 10^4 cfu/g değerinde olduğu gözlenmiştir. Bu değerlerle incelemeye aldığımız gıda örneklerinde *Bacillus cereus* vejetatif hücre sayısının gıda zehirlenmesi oluşturacak sınır değerlere çok yakın olduğu ortaya konmaktadır.

Bacillus cereus izolatlarının çeşitli biyokimyasal testler uygulanarak identifikasyonu yapılabilmektedir. Katı besiyerinden izole edilen *Bacillus cereus* kolonilerinin identifiye edilebilmesi için hemoliz reaksiyonu, glikozdan asit oluşturma, Voges-Proskauer reaksiyonu, nitratı nitrite indirgeme, katalaz testleri gibi çeşitli biyokimyasal testler uygulanması önerilmektedir [26]. Bu testlere ilave olarak jelatin hidrolizasyonu , rhizoidal büyüme, toksin kristallerinin tanımlanması, tirozin bozulması, anaerobik olarak glikoz fermentasyonu ve lizozime direnç testleri de *Bacillus cereus* identifikasyonu için uygulanabilmektedir [7]. Shinagawa [20] izolatların morfolojik açıdan identifikasyonu için gram ve spor boyama, biyokimyasal testler olan VP reaksiyonu, jelatin hidrolizi, hemoliz kuvveti, glikoz fermentasyonuna tabi tutulmasıyla pozitif sonuç veren mikroorganizmaları *Bacillus cereus* olarak değerlendirmiştir. *Bacillus cereus* strailerinin ayırt edilebilmesi için serotiplendirme, faj tiplendirmesi ve toksin üretimi açısından epidemiyolojik araçlar ile incelenebileceğini belirtmiştir.

Bacillus cereus'un sayımı ve identifikasyonu için uygulanan standart analiz yöntemlerinden biri olan ISO metodu (Borge ve ark., 2001), sayım için MYP agar besiyerine ekim yapılmasını, identifikasyonu için Voges- Proskauer, nitrat reaksiyonu, glukoz fermentasyonu testlerinin uygulanmasını önermektedir. USDA/ FSIS Mikrobiyoloji Laboratuvarı (Lattuada ve McClain, 1998), örneklerde *Bacillus cereus* sayımı için MYP agar kullanımına, identifikasyonu için hemolitik aktivite, hareketlilik, gelişme karakteristikleri (rhizoidal gelişme) ve protein toksin kristallerinin üretimi testlerini önermektedir [22].

Çalışmamızda parça et, kıyma, tavuk pırla, et sucuk ve et pastırma örneklerinden MYP agar besiyerine yapılan ekimler sonucunda gelişen yuvarlak, pembe renkli, yarı şeffaf, etrafını opak egg-yolk presipitasyon halkası sarmış olan koloniler *Bacillus cereus* olarak tanımlanmış ve saf kültür halinde elde edilen 34 izolat biyokimyasal identifikasyon testlerine tabi tutulmuştur. Bu testler sonucunda kuvvetli hemolitik olarak gözlenen 22 izolat *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır.

Bacillus cereus' un identifikasyonu için aynı zamanda hızlı test sistemleri de geliştirilmiştir. API 50 CH, API 20E (Logan ve ark. 1985, Weber ve ark., 1988, Guinebretiere ve ark., 2001) geliştirilen sistemlerdendir [18,22]. Sarrias ve ark. [18] çalışmalarında gıdalardan izole edilen türleri API 50CH ve API 20E tarafından tanımlanmış ve 3 API profili ile tahmini *Bacillus cereus* izolatlarını bulmuşlardır. Ancak bu izolatların daha kesin bir biçimde *Bacillus cereus* olarak tanımlanabilmesi için hareketlilik, oksidaz aktivitesi ve enterotoksin üretimi testlerinin de uygulanması gerekliliğini ortaya koymuşlardır [18]. Lagan ve ark. 1979 yılında emetik *Bacillus cereus* strainlerinin API sistem kullanılarak diyarel ve toksijenik olmayan *Bacillus cereus* strainlerinden ayırt edilebileceğini, fakat farklı karakterlerinin tanımlanamayacağını belirtmiştir [19]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise izole edilen *Bacillus cereus* strainlerinin toksin üretme yetenekleri araştırılmamıştır.

MYP ve PEMPA seçici besiyerlerinde benzer koloniler oluşturan *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* [21,23], fenotipik özelliklere dayanan temel biyokimyasal testlerde de benzer sonuçlar vermektedirler. Fakat bazı testlere cevap verme dereceleri farklıdır. *Bacillus cereus* çok kuvvetli hemolitik iken, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* zayıf hemolitik, *Bacillus anthracis* ise kanlı agarda hemoliz yapmaktadır. *Bacillus thuringiensis* faz kontrast mikroskobu ile ayır edilebilen enterotoksin kristalleri üretir. *Bacillus mycoides*' in ise nutrient agar üzerinde kendine has rhizoidal koloniler oluşturarak üreme özelliği bulunmaktadır [7,9,21]. Buna dayanarak çalışmamızda kanlı agar üzerinde hemoliz oluşturmayan 12 izolatu *Bacillus anthracis* olma olasılığı yüksektir. Temel identifikasyon testlerine dayanarak geriye kalan 22 izolatu *Bacillus cereus* olarak tanımlayabilmekteyiz.

Geleneksel taksonomik yöntemlerin sınırlı olduğunun farkına varılmasından sonra, mikrobiyal identifikasyon ve sınıflandırmada moleküler identifikasyon ve tiplendirme yöntemlerinin, özellikle moleküler genetik ve serolojik esaslı testlerin giderek rutin analizlere girmesi sonucu daha doğru bilgiler elde edilmeye başlanmıştır. Moleküler düzeyde identifikasyon ve tiplendirme yöntemleri ile nükleik asit hibridizasyonu, sekans analizleri ve protein profilleri elde edilmektedir. *Bacillus cereus* strainlerinin saptanmasında toplam hücre protein profillerinden yararlanan Matar ve ark. [29]' nın yapmış oldukları çalışmadır. Çekiç [42] (2000) Eskişehir ve çevresinde tüketilen süt ve süt ürünlerinden izole ettiği 10 adet *Bacillus cereus* straininde toplam hücre protein profillerini analiz etmiş ve birbirine benzer band profilleri gözlemiştir. Kotiranta ve ark. [43] (1999) yapmış oldukları çalışmada 2' si referans, 2' si klinik *Bacillus cereus*' un 4 farklı straininden elde edilen toplam hücre proteinleri SDS-PAGE yöntemiyle büyük protein bantlarının birbirinden ayrıldığı gözlenmiş ve 85 kDa molekül ağırlığında bant oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu 4 farklı *Bacillus cereus* strainine immunostaining ile anti S-layer antibody eklenmiş ve gamma-ışınları altında sıvı ile katı besiyerlerinde gelişime bırakılmıştır. Daha önce SDS-PAGE' de 85 kDa bantlaşma gösteren *Bacillus cereus* klinik strainlerinin 2' sinde gelişim sonunda bu bandı kaybettiği yerine S-layer proteinine ait 97 kDa bandını oluşturduğu; diğer iki referans strainin ise bu 97 kDa bandını oluşturmadıkları gözlenmiştir. Çalışma klinik strainlerin hücre yüzeyinde S-layer taşımalarının radyoaktif ışınlara direnci arttırdığı sonucuna ulaştırmıştır.

Çalışmamızda *Bacillus cereus* toplam hücre protein ekstraktları Viola ve ark. [35]'nin yöntemine göre sonikasyona tabi tutularak hazırlanmıştır. Elde edilen protein ekstraktlarının SDS-PAGE yöntemiyle hazırlanan jelde oluşturdukları belirli molekül ağırlığındaki bantlar, geniş aralıklı protein işaretleyicisi (Sigma M 4038) oluşturduğu bantlar ile karşılaştırılmıştır. Genel anlamda bütün örnekler ait protein profilleri birbirine benzer biçimde tespit edilmiştir. Tüm et ve et ürünlerinden elde edilen izolatların protein profillerinde, protein işaretleyicisinin temel bantlarından olan 14.2 kDa ağırlığındaki bandı oluşturduğu, yalnız k5 çukuruna yüklenen izolatın oluşturmadığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda SDS-PAGE tekniği ile toplam hücre protein ekstratlarında tam olarak ayırım görülmediği için örnekler birbirine yakın bant profilleri oluşturmuştur. Berber ve ark' nın.[27] 2003 yılında yapmış oldukları çalışmalarında olduğu gibi toplam hücre proteinlerinin yerine ekstraselüler proteinlerin yürütülmesiyle tiplendirmede daha ayır edici profiller verilebilir.

Çeşitli mikroorganizmaların tiplendirilmesinde proteinlerin ve lipoproteinlerin incelenmesi başarılı olmakla birlikte bu yöntemler bir mikroorganizmanın fenotipik özelliklerine dayanmaktadır. Dolayısıyla pek çok araştırmacı bir organizmayı fenotipik çeşitliliğe maruz kalmadan genotipini analiz etmeyi nükleik asit hibridizasyonu ve sekans analizleri gibi yöntemlerle çalışmayı tercih etmektedirler

Ombui ve ark [31] çalışmalarında süt örneklerinden 5 farklı büyüklükte plazmid saptamışlardır. Plazmidler ile antibiyotiklere dirençlilik arasında bir ilişki olup- olmadığını araştırmışlar, ancak böyle bir ilişki bulamamışlardır.

Milner ve ark. [44] (1996) yaptıkları çalışmada Zwitermisin A antibiyotiğini üreten *Bacillus cereus* strainlerinin antibiyotik üretimiyle ökaryotik hücrelere karşı kendi direncini kazandığı (self-resistance), *Bacillus cereus*' un ürettiği Zwitermisin A antibiyotiği gibi biyokimyasal aktivite gösteren molekülleri kodlayan biyosentetik genlerin aslında moleküler düzeyde identifikasyonda kullanılabileceği belirtilmiştir.

Nishikawa ve ark.'nın [45] (1996) yapmış oldukları çalışmada 5 ayrı gıda zehirlenmesi salgınından elde edilen, emetik sendroma neden olan 43 adet *Bacillus cereus* izolatu epidemiyolojik markerlar olan serolojik tiplendirme, biyotiplendirme, vakuolasyon faktör ve plazmid band örnekleri teknikleriyle değerlendirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Eğer salgınların gıdalardan kaynaklandığı gösterilmek isteniyorsa; plazmid bant örneklerinin analizinin aynı serotipe sahip izolatlar arasındaki ince farkları ayırt etmede oldukça kullanışlı olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda et ve et ürünlerinden elde ettiğimiz 22 adet izolatta plazmid varlığının, varsa plazmidlerin büyüklüğünün tespiti için *Bacillus cereus* hücrelerine Alkali- Lisis yöntemi uygulanmış ve e5 örneği hariç bütün izolatların hemen hemen aynı ağırlıkta plazmite sahip olduğu tespit edilmiştir. Bundan

sonraki çalışmalarda bizim rneklerimizdeki plazmidlerin fonksiyonu (rneğin; antibiyotik dirençliliği, PHB retimi) araştırılabilir. Kullanılan SDS-PAGE ve plazmid analizi teknikleri strainler arası farklılığı ortaya koymada yetersiz kaldığı için, bundan sonraki çalışmalarda RAPD-PCR (Ghelardi ve ark. 2002 [46]) yöntemi ile tiplendirme yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. AYHAN, K., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara, (2000).
2. *Mikrobiyolojik Analiz Yöntemlerinde Yeni Yaklaşımlar*, Hemakim Tıbbi Ürünler Tic. Ltd. Şti., (1999).
3. TÜBİTAK-MAM, *Gıda Sanayiinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları*, Marmara Araştırma Merkezi, Kocaeli, (1995).
4. American Medical Association, Centers for Disease Control and Prevention, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, Food Safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, *Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses, A Primer for Physicians*, Ocak , (2001).
5. SCHULTEN, S. M., VELD, P. H., NAGELKERKE, N. J. D., SCOTTER, S., BUYSER, M. L., ROLLIER, P., ve LAHELLEC, C., *Evaluation of the ISO 7932 standart for the enumeration of Bacillus cereus in food*, *International Journal of Food Microbiology*, **57**, 53-61, (2000).
6. PATEL, P.T., *Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*, Blance & Professional, London, (1994).
7. ERKMEN, O., *Basic Methods for the Microbiological Analysis of Foods*, Gaziantep Üniversitesi Yayınları, (2000).
8. AGATA, N., OHTA, M., ve YOKOYAMA, K., *Production of Bacillus cereus Emetic Toxin (cereulide) in various foods*, *International Journal of Food Microbiology*, **73**, 23-27, (2002).
9. WATSON, J.D., GILMAN, M., WITKOWSKI, J., ve ZOLLER, M., *Rekombinant DNA*, 2. Ed. , Scientific American Books, (1992).
10. SHINGAWA, K., KONUMA, H., TOKUMARU, M., TAKEMASA, N., HASHIGIWA, M., SHIGEHSA, T., ve LOPES, A. M., *Enumeration of Aerobic Spore-Formers and Bacillus cereus in Meat Product Additives*, *Journal of Food Microbiology*, **51**, **8**, 648-650, (1988).
11. TERNSTRÖM, A., ve MOLIN, G., *Incidence of Potential Pathogens on Raw Pork, Beef and Chicken in Sweden, with Special Reference to*

- Erysipelothrix rhusiopathiae*, Journal of Food Protection, **50**, **2**, 141-146, (1987).
12. AKSU, H., ve ERGÜN, Ö., *Gıda Maddelerinde Bacillus cereus' un Varlığı, Kükem Dergisi*, Cilt. 19, Sayı.2, s. 41-47, (1996).
 13. VAZGEÇER, B., ULU, H., ve OZTAN, A., *Mikrobiological and Chemical Qualities of Chicken Döner Kebap Retail on the Turkish Restaurants*, Food Control, article in press- corrected proof., 2004.
 14. FANG, T. J., WEI, Q., LIAO, C., HUNG, M., ve WANG, T., *Microbiological quality of 18 °C ready-to-eat food products sold in Taiwan*, International Journal of Food Microbiology, **80**, 241- 250, (2003).
 15. NEL, S., LUES, J.F.R., BUYS, E.M., ve VENTER, P., *Bacterial Populations Associated with Meat from the Deboning Room of High Throughput Red Meat Abattoir*, Meat Science, **66**, 667-674, (2004).
 16. NORTJE, G.L., VORSTER, S.M., ve GREEBE, R.P., ve STEYN, P.L., *Occurrence of Bacillus cereus and Yersinia Enterocolitica in South Africa Retail Meats*, Food Microbiology, **16**, 213-217, (1999).
 17. SCHLEELOVA, J., BRYCHTA, J., KLIMOVA, E., NAPRAVNIKOVA, E., ve BABAK, V., *The Prevalence of and Resistance to Antimicrobial Agents of Bacillus cereus Isolates from Foodstuffs*, Vet. Med., **48**, **11**, 331-338, (2003).
 18. SARIÁ, J.A., VALERO, M., ve SALMERON, M.C., *Enumeration, Isolation And Characterization of Bacillus Cereus Strains from Spanish Raw Rice*, Food Microbiology, **19**, 598-595, (2002).
 19. BLAKEY, L.J., ve PRIEST, F.G., *The Occurrence of Bacillus cereus in some Dried Foods Including Pulses and Cereals*, Journal of Applied Bacteriology, **48**, 297-302, (1980).
 20. SHINAGAWA, K., *Analytical methods for Bacillus cereus and other Bacillus species*, International Journal of Food Microbiology, **10**, 125-142, (1990).

21. LATTUADA, C.P., ve McCLAIN, D., *Examination of Meat and Poultry Products for Bacillus cereus*, USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd Edition, (1998).
22. WIJNANDS, L.M., DUFRENNE, J.B., ve van LEUSDEN, F.M., *Characterization of Bacillus cereus*, RIVM report 250912002 for Healty Protection and Veterinary Public Health, (2002).
23. PENG, H., FORD, V., FRAMPTON, E.W., RESTAINO, L., SHELEF, L.A., ve SPITZ, H., *Isolation and Enumeration of Bacillus cereus from Foods on a Novel Chromogenic Plating Medium*, Food Microbiology, **18**, 231-238, (2001).
24. AKSU, H., *Ülkemizde Tüketime Sunulan Çeşitli Hazır Gıdalarda Bacillus cereus' un Varlığı ve Önemi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (1994).
25. BLACKIE, A&P., *Microorganisms in Food, Bacillus cereus*, 20-35, (1996).
26. TS 6404 EN ISO 7932, *Mikrobiyoloji-Bacillus cereus Sayımı için Genel Kurallar- Koloni Sayım Tekniği (30 °C' da)*, TSE, (2000).
27. BERBER, I., COKMUS, C., ve ATALAN, E., *Characterization of Staphlococcus species by SDS-PAGE of Whole- Cell and Extracellular Proteins*, Mikrobiyolojiya, **72**, **1**, 54-59, (2003).
28. VIOLA,D.G., ve LOPEZ, D., *Numerical Analysis of Electrophoretic Periplasmic Protein Patterns, a Possible Marker System for Epidemiologic Studies*, Journal of Clinical Microbiology, **28**, **1**, 136-139, (1990).
29. MATAR, G.M., SLIEMAN, T.A., ve NABBUT, N.H., *Subtyping of Bacillus cereus by Total Cell Protein Patterns and Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction*, European Journal of Epidemiology, **12**, 309-314, (1996).
30. WATSON, J.D., GILMAN, M., WITKOWSKI, J., ve ZOLLER, M., *Rekombinant DNA*, 2. Ed., Scientific American Books, (1992).
31. OMBUI, J.N., MATHENGE, J.M, KIMOTHU, A.M., MACHARIA, J.K., ve NDUHIU, G., *Frequency of Antimicrobial Resistance and*

- Plasmid Profiles of Bacillus cereus strains Isolated from Milk*, Vet. Med.- Czech, **73**, **6**, 380- 384, (1996).
32. TAMER, A. Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M., ve OĞULTEKİN, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Anadolu Üniversitesi Eğitim, Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, **74**, Eskişehir, (1989).
33. MORITA, T. N., ve WOODBURN, M. J., *Stimulation of Bacillus cereus Growth by Protein in Cooked Rice Combinations*, Journal of Food Science, **42**, **5**, (1977).
34. DURLU-ÖZKAYA, F., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara, (2000).
35. VIOLA, D.G., ve LOPEZ, D., *Numerical Analysis of Electrophoretic Periplasmic Protein Pattern, a Possible Marker System for Epidemiologic Studies*, Journal of Clinical Microbiology, **12**, 136-139, (1990).
36. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., ve MANIATIS, T., *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, **3**, **18**. 47-.59, (1989).
37. TEMİZKAN, G., ve ARDA, N., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Tıp Kitap Evi, 26-28; 34-39, (1999).
38. NORTJE, G. L, VORSTER, S. M., GREEBE, R. P., ve STEYN, P. L., *Occurrence of Bacillus cereus and Yersinia enterocolitica in South Africa Retail Meats*, Food Microbiology, **16**, 213-217, (1999).
39. PHELPS, R. J., ve MCKILLIP, J. L., *Enterotoxin Production in Natural Isolates of Bacillaceae Outside the Bacillus cereus Group*, Applied and Environmental Microbiology, 3147- 3151, Haziran (2002).
40. WALKER, J., *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, (1996).

41. TOR KAR, K.G., ve MATIJASIC, B.B., *Partial Characterisation of Bacteriocins Produced by Bacillus cereus Isolates from Milk and Milk Products*, Food Technol. Biotechnol., **42, 2**, 121-129, (2003).
42. ÇEKİÇ, Y., *Çeşitli Gıdalarda Bacillus cereus Kontaminasyonunun Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, (2001).
43. KOTIRANTA, A.K. ITO, H., HAAPASALO, P.P., ve LOUNATMAA, K., *Radiation Sensitivity of Bacillus cereus with and without a Crystalline Surface Protein Layer*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 179, p. 275-280, (1999).
44. GHELARDI, E., CELANDRONI, F., SALVETTI, S., BARSOTTI, C., BAGGIANI, A., ve SENESI, S., *Identification and Characterization of Toxigenic Bacillus cereus Isolates Responsible for two Food-Poisoning Outbreaks*. FEMS Microbiology Letters, **208**, 129-134, (2002).