ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşenur ÜN

PİRİNÇ UNU VE PİRİNÇ UNU BAZLI GIDA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus cereus*' un KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2020

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PİRİNÇ UNU VE PİRİNÇ UNU BAZLI GIDA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLECEK *Bacillus cereus*' UN KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

Ayşenur ÜN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Işıl VAR
Yıl: 2020, Sayfa: 67
Jüri : Prof. Dr. Işıl VAR
: Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
: Dr. Öğr. Üyesi Sinan UZUNLU

Doğada yaygın olarak bulunan *Bacillus cereus,* bir yandan gıda bozulmaları, diğer yandan kusma ve ishal gibi şikâyetler ile insanlarda gıda zehirlenmelerine sebep olan ve intoksikasyon yapan bir bakteridir.

Bu çalışmada *Bacillus cereus* varlığını araştırmak üzere pirinç unu ve pirinç unu bazlı toplam 192 adet gıda örneği kullanılmıştır ve örnekler Adana piyasasından tedarik edilmiştir.

Klasik yöntem ile izole edilen toplam 32 izolattan 10'u *Bacillus cereus* olarak tanımlanırken, 14'ü *Bacillus subtilis*, 4'ü *Escherichia coli*, 2'si *Pseudomonas aeruginosa*, 2'si *Proteus mirabilis* olarak belirlenmiştir. İzolatların 74 bebek maması örneğinin 18'sinden (oransal olarak %24.3), 50 ambalajlı pirinç unu örneğinin 11'sinden (oransal olarak %22), 10 dökme satılan pirinç unu örneğinin 3'ünden (oransal olarak %30) olduğu tespit edilmiştir. Klasik yöntemle *Bacillus cereus* olarak tanımlanan suşlar PCR yöntemi ile moleküler olarak da tanımlanmıştır. *Bacillus cereus*'ların genotipik yakınlıklarının tespiti amacı ile RAPD- PCR yöntemi kullanılmıştır ve çalışmaya bütün suşlar dahil edilmiştir. *Bacillus cereus* suşlarının arasındaki genetik yakınlık incelendiğinde %70'lerde kaldığı görülmüştür. Sonuç olarak; genetik olarak birbirlerinden farklı oldukları ve tek kaynaktan köken almadıkları

Anahtar Kelimeler*:* *Bacillus cereus,* pirinç unu, PCR, RAPD-PCR,

ABSTRACT

MSc THESIS

ISOLATİON OF *Bacillus cereus* FROM RICE FLOUR AND RICE FLOUR BASED FOOD SAMPLES AND IDENTIFICATION USING CLASSICAL AND MOLECULAR METHODS

Ayşenur ÜN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Supervisor : Prof. Dr. Işıl VAR
Year: 2020, Pages:67
Jury : Prof. Dr. Işıl VAR
: Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
: Asst. Prof. Dr. Sinan UZUNLU

Bacillus cereus, which is widely found in nature, is a pathogenic bacteria that causes food poisoning in humans with complaints such as food spoilage on the one hand and vomiting and diarrhea on the other. In this study, a total of 192 food samples including rice flour and rice flour-based food samples supplied from Adana market were examined for the presence of *Bacillus cereus.*

Only 10 of the 32 isolates isolated from the examined samples by classical method were defined as *Bacillus cereus*. 14 of the isolates were determined as *Bacillus subtilis*, 4 as *Escherichia coli*, 2 as *Pseudomonas aeruginosa* and 2 as *Proteus mirabilis*. The isolation was performed from 18 of 74 infant formula samples (24.3% proportionally) and 11 of 50 packed rice flour samples (22% proportionally) 3 of 10 unpackaged rice flour samples (30% proportionally). Also, the strains defined as *Bacillus cereus* by the classical method were also defined molecularly using the PCR technique. The RAPD-PCR method was used to determine the genotypic affinity of *Bacillus cereus* and all strains were included in the study. When the genetic affinity between *Bacillus cereus* strains was examined, it was seen that it remained at 70%. As a result; have been shown that strains to be genetically different from each other and not originated from a single source.

Key words: *Bacillus cereus,* Rice Flour, PCR, RAPD-PCR

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

İşlem görmemiş pirincin %15'ini oluşturan kırık beyaz pirinç taneleri kullanılarak elde edilen pirinç unu, TS 2639 Pirinç Unu Standardı'nda "ince öğütülmüş, kaba kısımları elenerek ayrılmış bir pirinç mamulü" olarak tanımlanmıştır (Anonymous, 1977).

Pirinç unu birçok gıdanın üretiminde hammadde veya teknik yardımcı madde olarak kullanılmaktadır. Bebek mamaları, hazır toz formdaki pudingler, hazır toz formda çorbalar, bazı tatlılar, bisküvi, waffle, kek gibi birçok gıda bu grupta yer almaktadır. Pirinç unu üretimi; hammadde (pirinç) temini, pirinç tanelerinin kabuğunun ayrıştırılması, fumigasyon ve havalandırma, kurutma, öğütme, eleme, paketleme, depolama ve pazarlama aşamalarını içermektedir (Şahin, 2010).

Bacillus cereus, gram pozitif, çubuk şeklinde, peritrik flagelları ile hareketli sentral, subterminal yapıda elipsodial sporları olan, aerob patojen bir bakteridir (Ayhan, 2000). *Bacillus cereus*'un yaşlı kültürleri ile yapılan Gram boyama sonucu değişkenlik göstererek bazen Gram negatif olarak da gözlemlendiği bildirilmektedir (Kalkan ve Halkman, 2006).

Bacillus cereus enerji metobolizması için gerekli olan karbonu fermantasyon yolu ile sağlar, nitrojen kaynağı olarak ise üre ve amonyağı kullanır, azotlu proteinleri hidrolize ederek kokuşmaya neden olur (Kaynar ve Beyatlı 2006).

Toprak kökenli olan *Bacillus cereus*'a çürüyen organik materyallerde, tozda, suda, tarla ve bahçe ürünlerinde rastlanılmaktadır (Ayhan, 2000). Başta tahıllar olmak üzere özellikle pirinçte, süt ve süt ürünlerinde, ette, sebzede, yumurta ve baharatlarda, kurutulmuş gıdalarda *Bacillus cereus*'a rastlanılmaktadır (Beecher ve Wong, 2000).

Sporlu olan bu bakterinin sporları metabolik aktivite göstermeksizin yıllarca canlılığını sürdürebilmektedir ve sporlar farklı nem, pH, sıcaklık vb.

koşullara karşı oldukça fazla direnç göstermektedir. Sporlar hidrofobik özelliğe sahiptir ve bu nedenle yüzeylere (alet-ekipman) yapışma eğilimindedir (Ayhan, 2000; Henriques ve Moran 2007).

Psikrotrof suşlara sahip olan *B.cereus* bu özelliği sayesinde geniş sıcaklık aralığında üreme yeteneğindedir. *Bacillus cereus,* lipoproteinleri parçalayan lipaz enzimini üreterek lipid oksidasyonuna sebep olmaktadır ve lipid oksidasyonu sonucu meydana gelen kısa zincirli yağ asitleri gıdaların sahip olduğu kendine has kokusunu kaybetmesine neden olmaktadır. *Bacillus cereus* proteolitik özelliği sayesinde de proteinleri hidrolize ederek koku ve tat bileşenleri üzerinde olumsuz etkiye neden olmaktadır. Aynı zamanda *B.cereus*'un biyofilm formunda da bulunması temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerine karşı direnç göstermesine sebep olmaktadır. Sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı gıdalarda koku ve tat bozulmalarına sebep olan *Bacillus cereus* gıda hijyeni açısından da üzerinde durulması gereken önemli bir mikroorganizmadır (Serdaroğlu ve Tömek, 1995).

B.cereus gıdalarda yüksek seviyede bulunmadığında önemli bir tehlike oluşturmamaktadır. Pişirilme sıcaklığına dayanıklı olan sporlar, ısıtılan gıdalarda vejetatif hale geçerek çoğalmakta ve muhafaza sıcaklığı 10-50°C aralığında olan pişmiş gıdalarda, toksin üreterek kısa sürede ve hızla çoğalabilmektedir (Faille, 2002).

B. cereus diyare (ishal) tipte ve emetik (kusma) tipte iki çeşit gıda zehirlenmesine neden olmaktadır.

İshal tipi gıda zehirlenmesine tekli protein yapısında olan Cytotoxin K, Enterotoxin T, Enterotoxin FM ve protein komplekslerinden oluşan Non-hemolitik enterotoksin (Nhe) ve Hemolisin BL (Hbl) toksinleri sebep olmaktadır (Fagerlund ve ark. 2004). Bu zehirlenmede gıdaların alınmasından 8 ile 16 saat içerisinde sulu diyare ve karın ağrısı şeklindeki belirtiler oluşur ve bu belirtiler 12-24 saat sonra geçmektedir. *Clostridium perfringens* gıda zehirlenmesine benzerlik gösteren bu zehirlenmede *C. perfringens* enterotoksininin aksine, *B. cereus* toksini vejetatif bir büyüme metabolitidir ve fosfolipaz ve cereolysinden ayrılabilir (Jay, 1970) ve ishal

tip zehirlenmeyi meydana getirir. Bu nedenle *Bacillus cereus* vejetatif hücre veya sporlarının gıdalarda bulunması büyük önem taşımaktadır (Sekin ve Karagözlü, 1997).

Kusma tipi gıda zehirlenmesinde mide bulantısı ve kusma belirtileri ishal tipi zehirlenmeye göre daha kısa zamanda (1 ile 5 saat arasında) görülmektedir. Genellikle 24 saat sürmeden belirtiler spontan olarak ortadan kalkar. Bu tip zehirlenme *Staphylococcus aureus* gıda zehirlenmesi ile benzerlik göstermektedir (Haggblom ve ark. 2002). Stafilokokal enterotoksinin aksine, emetik toksinin moleküler ağırlığı 10 kda'dan azdır ve perfringens enterotoksinine benzer şekilde sporla ilişkili olabilir. Isıya dayanıklıdır ve neredeyse sadece serotip 1 suşları tarafından üretilir (Jay, 1992). Kusma tipi gıda zehirlenmesi yüksek ısıya, aside, alkaliye ve hatta otoklavlanmaya karşı oldukça dirençli olan Cereulide toksin tarafından gerçekleştirilir. Sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı Cereulide uzun süre yüksek ısıda stabil kalabilmekte (Jay, 1970) ve bu durum gıdanın işlenmesi sırasında tehlike oluşturmaktadır (Çöl, 2014).

Bu çalışmada bebek ve yetişkin beslenmesinde önemli yere sahip olan ve *Bacillus cereus* varlığı açısından risk taşıyan pirinç unu ve pirinç unu bazlı gıdalar Adana piyasasından temin edilmiştir ve *Bacillus cereus* varlığı yönünden analize alınmıştır.

Pirinç unu ve pirinç unu bazlı gıda örneklerinden *Bacillus cereus* aranmasında klasik izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Analize alınan toplam 192 örnekten, 74 bebek maması örneğinde 18, 60 pirinç unu örneğinin 14'ünde olmak üzere toplam 32 izolat elde edilmiştir. İzolatlara uygulanan gram boyama, katalaz, indol, hareketlilik, jelatin hidrolize, metil red, sitrat, Voges Proskauer testleri ile 10'unun *Bacillus cereus,* 14'ünün *Bacillus subtilis,* 4'ünün *Escherichia coli,* 2'sinin *Proteus mirabilis,* 2'sinin *Pseudomonas aeruginosa* olduğu görülmüştür. Klasik kültürel yöntem ile *Bacillus cereus* olarak tanımlanan suşlar klasik PCR yöntemi kullanılarak da doğrulanmıştır. Bunun yanı sıra, RAPD-PCR tekniği kullanılarak *Bacillus cereus* suşlarının birbirlerine olan genetik yakınlıklarına

bakılmış ve yakınlıkların düşük (%70) olduğu ve tek bir kaynaktan köken almadıkları görülmüştür.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana yol gösteren, tez çalışmamın gerçekleştirilmesi sırasında her aşamada yardımlarını sunan, bilgisini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Prof.Dr. Işıl VAR'a, çalışmam sırasında her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, kendi laboratuar imkanlarından faydalanmama olanak sağlayan, gerek uygulama gerekse yazım aşamasında bilgi ve tecrübelerini hiç tereddüt etmeden paylaşan sevgili büyüğüm ve değerli hocam Prof.Dr. Fatih KÖKSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren değerli Dr. Öğr. Üyesi Sinan UZUNLU'ya her konuda bana yardımcı olan, arkamda duran değerli eşim Çağrı ÜN'e ,biricik kızım İpek ÜN'e ve kıymetli ailelerime, çalışmam süresince bana her aşamada destek veren değerli YL öğrencisi Seda Sultan YILMAZ'a ve çalışmamın moleküler kısmında desteklerini esirgemeyen Arş.Gör. Gülfer YAKICI'ya, her anlamda bilgisini esirgemeyen doktora öğrencisi Sevgi ERGELDİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ XII
ŞEKİLLER DİZİNİ XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR XVI
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 13
2.1. *B. cereus* Toksinleri ve Toksin Genlerinin Varlığı 18
3. MATERYAL VE METOT 21
3.1. Materyal 21
3.1.1. Pirinç unu 21
3.1.2. Toz puding 21
3.1.3. Toz Çorba 21
3.1.4. Bebek Maması 21
3.1.5. Besiyerleri ve Kimyasallar 23
3.1.5.1. Egg Yolk Emulsiyon Sterille (Merck 103784) 23
3.1.5.2. *Bacillus cereus* Selective Supplement (Merck 109875) 23
3.1.5.3. MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Agar (base) (Merck 105267) 23
3.1.5.4. Peptone Water (Peptonlu Su) (Merck 107214) 24
3.1.5.5. Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458) 24
3.1.5.6. Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459) 24
3.1.5.7. SIM Medium (Merck 1.05470) 24
3.1.6. Gram Boyama İçin Kullanılan Kimyasallar 25

3.1.7. Çözelti ve Solusyonlar 26
3.1.7.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer 26
3.1.7.2. 1 xTE Buffer 27
3.1.7.3. PCR Buffer 28
3.1.7.4. Tris (1M) 28
3.1.7.5. %2 'lik Agaroz jel 28
3.1.8. PCR Uygulaması 29
3.1.8.1. Primerler 29
3.1.8.2. Elektroforez 29
3.1.8.3. Marker 29
3.1.8.4. Ethidium Bromid 30
3.2. Metot 30
3.2.1. Gıda Örneklerinden *Bacillus cereus* İzolasyonu 30
3.2.2. İzole Edilen Şüpheli Kolonilerin Tanımlanması 31
3.2.2.1. Morfolojik Tanımlama 31
3.2.2.1.(1). Bakteri Koloni Morfolojisinin İncelenmesi 31
3.2.2.1.(2). Bakteri Hücre Morfolojisinin İncelenmesi 31
3.2.2.2. Biyokimyasal Tanımlama 32
3.2.2.2.(1). İndol Testi 32
3.2.2.2.(2). Katalaz Testi 33
3.2.2.2.(3). Oksidaz Testi 33
3.2.2.2.(4). Jelatin Hidrolize Testi 34
3.2.2.2.(5). Voges Proskauer(VP) testi 34
3.2.2.2.(6). Metil Red (MR) Testi 34
3.2.2.2.(7). Sitrat Testi 35
3.2.2.3. Moleküler Tanımlama 35
3.2.2.3.(1). Dondur Çöz Yöntemi ile Kolonilerden DNA İzolasyonu 35
3.2.2.3.(2). motB gen bölgesinin PCR amplifikasyonu 36

3.2.2.3.(3). RAPD-PCR amplifikasyonu 37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 39
4.1. Gıda Örneklerinden *Bacillus cereus* İzolasyonu ve Tanımlanması 39
4.1.1. Şüpheli *Bacillus cereus* 'ların Koloni Morfolojileri 39
4.1.2. Tipik *Bacillus cereus* Kolonilerinden Farklı Olan Kolonilerin Morfolojisi 39
4.1.3. Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Hücre Morfolojileri 43
4.1.4. Gıda Örneklerinden İzole Edilen Diğer İzolatların Hücre Morfolojileri 44
4.2. Şüpheli İzolatların Biyokimyasal Tanımlaması 44
4.3. Klasik Kültürel Yöntemle İzole Edilen Şüpheli *Bacillus cereus*'ların Moleküler Yöntemle Doğrulanması 49
4.4. Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların RAPD -PCR İle genetik yakınlıklarının tespiti 50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 55
KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ 67

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Genetik olarak yüksek benzerliğe sahip *Bacillus* türleri ve özellikleri 3

Çizelge 1.2. *Bacillus cereus* 'un biyokimyasal özellikleri 4

Çizelge 1.3. Türk Gıda Kodeksi *Bacillus cereus* Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, ... 6

Çizelge 1.4. *B. cereus* kaynaklı zehirlenmelerin tipik özellikleri 8

Çizelge 3.1. Çalışılan gıda örneklerinin (ambalajlı pirinç unu, bebek maması, toz puding, toz çorba) ait olduğu firmalar, içerikleri ve alınan örnek sayıları 22

Çizelge 3.2. PCR işleminde kullanılan primerler..... 29

Çizelge 3.3. RAPD-PCR işleminde kullanılan primerler..... 29

Çizelge 4.1. Çalışılan Gıda Örneklerinden İzole edilen şüpheli *Bacillus cereus* izolatları ile diğer izolatların kaynak ve sayısı 40

Çizelge 4.2. *Bacillus cereus'*dan Farklı Koloni Özelliği gösteren izolatlar 41

Çizelge 4.3. Şüpheli *Bacillus cereus* İzole Edilen Örnekler ve Kodları 42

Çizelge 4.4. Çalışılan Örneklerden Elde Edilen İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları 44

Çizelge 4.5. *Bacillus cereus* 'un hücre morfolojisi ve biyokimyasal özellikleri 46

Çizelge 4.6. MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Agar'da gelişebilen refakatçi floranın koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri 47

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 3.1. Şüpheli *Bacillus cereus* 'ların Mikroskop Görüntüsü 32

Şekil 4.1. *Bacillus cereus* Şüpheli Kolonilerinin MYP Agar'da Görüntüsü 39

Şekil 4.2. MYP Agar' da Gelişen Farklı Kolonilerin Görüntüsü 40

Şekil 4.3. Örneklerden izole edilen *Bacillus cereus* izolatlarından ekstrakte edilmiş DNA örneklerine uygulanan PCR sonucu elektorforezdeki DNA bant görüntüleri..... 50

Şekil 4.4. Şüpheli Kolonilerden Ekstrakte Edilen DNA Örneklerine Uygulanan RAPD-PCR elektroforez Jel Görüntüsü 51

Şekil 4.5. İzole edilen suşların dendogram ile ilişkilerinin gösterilmesi 53

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
aw	: Su Aktivitesi
CDC	: Cominicable Diseases Center:Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CytK	: Sitotoksin K
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
EntFM	: Enterotoksin FM
FDA	: 'Food and Drug Administration' 'Gıda ve İlaç Dairesi'
FAO	: Food and Agriculture Organization'Gıda ve Tarım Örgütü
HBL	: Hemolizin BL
ISO	: 'International Organization for Standardization' Uluslararası Standardizasyon Örgütü
g	: Gram
kb	: Kilobaz
kob	: Koloni Oluşturma Birimi
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MYP	: Mannitol Egg Yolk Polimiksin Agar
NHE	: Hemolitik Olmayan Enterotoksin
pH	: Hidrojen iyonları konsantrasyonu
PCR	: Polymerase Chain Reaction' (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
w/v	: Hacimde ağırlıkça yüzde
RAPD	: Randomly amplified polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RAPD-PCR : Randomly amplified polymorphic DNA -Polymerase ChainReaction (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA - Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

1. GİRİŞ

Bacillaceae familyasından olan *Bacillus* genusu içerisinde yer alan *Bacillus cereus*'a, toprak kökenli olmasından dolayı bahçe ve tarla mahsüllerinde, çürüyen organik materyallerde, tozda, suda sıklıkla rastlanılmaktadır. Patojen bir bakteri olan *Bacillus cereus* gıda zehirlenmelerine de sebep olmaktadır. (Ayhan, 2000).

Bacillus cereus, 0.5-2.5 µm genişliğinde, 1.2-10 µm uzunluğunda ve çomak şekilli olup mikroskop altında çift ya da kısa flamentöz şekillerde görünmektedir. Peritrik flagellaları sayesinde hareket eden *Bacillus cereus*, aeorob ve sporlu, gram pozitif bir bakteridir (Kalaylı ve Beyatlı 2003). Ancak *Bacillus cereus*'un yaşlı kültürlerine yapılan gram boyama sonucu hücreler değişkenlik göstererek bazen gram negatif sonuç da verebilmektedir (Kalkan ve Halkman, 2006).

Bacillus cereus' un ortalama üreme sıcaklığı 30-40°C'tir. 4-55°C gibi çok geniş sıcaklık aralığında da üreyebilirler. Gelişebildiği minimum su aktivitesi (aw) değeri 0.93aw olup, üreyebildiği optimal pH aralığı 4.9-9.3'tür. Ortalama %7.5-10 oranında NaCl içeren ortamlarda ise *Bacillus cereus*'un birçok suşu üreyebilmektedir (Forsythe, 2000). Aeorob bir mikroorganizma olan *Bacillus cereus*'un gelişebileceği ortamın oksido-redüksiyon potansiyeline (O/R) bakıldığı zaman pozitif Eh değerlerinde üreme gösterdiği görülmektedir (Ayhan,2000). *Bacillus cereus'*un gastrointestinal sistemden geçişi sırasında farklı Ph ve redoks stresleri ile karşılaşmakta olduğu ve *B. cereus* sporları ile vejetatif hücrelerin asidik-oksidatif mideye ve nötr-indirgeyici ince bağırsağa (Eh7 ¼ 150 mV) ulaştığı hatta bu koşullarda canlılığını koruyabildiği bildirilmektedir (Lay ve ark., 2014).

Karbonhidratlardan aldığı karbonu ve fermentasyon yaparak açığa çıkan organik asit ile alkolü enerji metabolizması için kullanan *Bacillus cereus* fermentasyon sonunda asit oluşturur ve gaz çıkışı gözlemlenmez (Kalkan ve Halkman 2006). Nitratı redükte etme yeteneği olan *Bacillus cereus* amonyak ve

üreyi nitrojen ihtiyacı için kullanır. Aynı zamanda azot içeren proteinleri su yardımıyla parçalar ve kokuşmaya neden olur. Bu özelliklerinin yanında *Bacillus cereus* suşları lesitin enzimi bulundurmaktadır ve ampisiline karşı direnç gösterirken hemolitik aktivite de gösterirler(Kaynar ve Beyatlı 2006).

Bacillus cereus yaşamsal tehdit eden çevre koşulları ile karşılaştığında spor oluşturarak yaşamını sürdürür. Sporlar hücrenin ortasında ya da ucunda olsa bile, vejatatif hücrenin çapına göre küçüktür ve basilin şeklini bozmaz (Kalkan ve Halkman 2006,Wijnands 2006). Yaklaşık 6 saatte oluşan sporlar ortamda gıda olmamasına rağmen metabolik aktivite göstermeksizin çok uzun süre canlılıklarını koruyabilmektedirler (Forsythe 2000). Farklı nem, pH, sıcaklık vb.şartlara karşı *B.cereus* sporları oldukça yüksek direnç göstermektedir Aynı zamanda *Bacillus cereus* sporları vejetatif formlara kıyasla ısıya, toksik kimyasallara, kurumaya, Ultra viyole ve gama ışınlarına karşı oldukça fazla direnç göstermektedir. Bu bağlamda ortamdaki 1.25-4 kGy ışın miktarı *Bacillus cereus* sporlarını %90 oranında azaltmak için ancak yeterli iken, vejetatif form 0.17-0.65 kGy ışın miktarında azalmaktadır. *Bacillus cereus* sporlarının, sahip olduğu hidrofobik özellik diğer *Bacillus* cinsi bakteri sporlarına oranla daha fazladır ve bu durumdan dolayı gıdanın işlenmesi ve üretimi sürecinde prosesde kullanılan yüzeylere ekipman ve aletlere yapışma eğilimindedirler. *Bacillus cereus* sporları pastörizasyon sıcaklığında canlılıklarını koruyabildiklerinden süt ve süt ürünlerine uygulanan pastörizasyon işleminden etkilenmezler. (Özdemir,2003).

Bacillus cinsleri sporangium ve sporlarının morfolojilerine göre gruplanmışlardır. 3 gruba ayrılan *Bacillus* cinslerinden birinci grupta bulunanlar içlerinde 1A-1B olarak ayrılırken diğer gruplar 2 ve 3 grupları olarak ayrılmaktadır. Birinci grup içerisinde yer alan *Bacilluslar* gram pozitiflerdir ve sporangia şişmemiştir Sporlar hücrenin ortasında veya ucunda olabilirken, silindirik ya da elips yapıdadırlar. İkinci grupta bulunan *Bacillus*ların sporangiaları şişmiştir ve sporun konumu terminal ve subterminaldir. *B. macerans, B.circulans, B. stearothermophilus, B. polymyxa, B. alvei* ikinci grupta yer almaktadır. Üçüncü

grupta yer alan *Bacillus* türlerinde sporun şekli küresel ve konumu. terminal ve subterminaldir. Sporangia şişmiştir. *B. sphaericus* bu gruba örnek verilebilir (Kalaylı ve Beyatlı 2003).

1A grubu içerisinde yer alan ve "Cereus Grubu" nu oluşturan *B.cereus, B. anthracis, B. thuringiensis, B. mycoides, B. pseudomycoides, B. weihenstephanensi* G+C mol oranları %32–62 olup 16s rRNA sekansları %99 oranında benzerlik göstermektedir (Kalkan ve Halkman,2006). Fenotipik özellikleri ile birbirlerinden ayrılan fakat genetik yapıları oldukça benzer olan bu türler Çizelge 1.1'de gösterilmiştir (Granum ve Lindbäck 2013).

Çizelge 1.1. Genetik olarak yüksek benzerliğe sahip *Bacillus* türleri ve özellikleri

Türler	**Koloni morfoloji**	**Hemoliz**	**Hareketlilik**	**Penisilin duyarlığı**	**Parasporal Kristal İçermesi**
B. cereus	Kırmızı	+	+	-	-
B. anthracis	Beyaz	-	-	+	-
B. thuringiensis	Beyaz/gri	-	+	-	+
B. mycoides	Yeşil	(+)	-	-	-

Bacillus cereus' un biyokimyasal özellikleri Çizelge 1.2'de gösterilmiştir (Kalkan ve Halkman, 2006)

Çizelge 1.2. *Bacillus cereus* 'un biyokimyasal özellikleri

Gram reaksiyonu	+	**Biyokimyasal Özellikler**	
Gelişme şartları		**Karbonhidrat kullanma**	
%7.5 NaCl	G	**özellikleri**	
Anaerobik	G	Glikoz	+
Spor özellikleri		Arabinoz	-
Merkezi	+	Mannitol	-
Toparlak	-	Ksiloz	-
Elipsoidal	+	**Jelatin sıvılaştırma**	-
Terminal veya subterminal	-	**İndol**	-
		Katalaz	+
		Nitrat redüksiyonu	+
		Üreaz	V
		Voges Proskauer^{0}	+
Kapsül	-	**Lesitinaz**	+
		β- hemolizis %SBA	V*^{n}
		OF glikoz	F
Hareketlilik	V*	**Simmons Nitrat**	+

V**:** Degişken**;** V***:** genellikle pozitif ,değişken,**;** G**:**gelişme gösteren; SBA**:** Sheep Blood Agar; n **:** %5 Sheep Blood Agarda β-hemolizis pozitif *B. cereus*; Voges Proskauer^{0}**:** 37°C de 24 saat inkübasyon

B.cereus ile kontaminasyona uğramış gıdalara yeteri kadar ısıl işlem uygulanmazsa, gıda hazırlandıktan sonra tüketilme süresi uzar ve tüketilmesi için uygun olan sıcaklıklara hemen soğutulmazsa, ısıya dirençli ve canlılığını koruyan sporlar vejatatif form alır ve bu durum gıdanın içindeki canlı mikroorganizma sayısının gıda zehirlenmesine sebep olabilecek düzeye ulaşmasına sebep olur(Güler, 2006).

Uzun yıllardan beri gıda zehirlenmelerine sebep olan *Bacillus cereus'* un etiyolojik bir ajan olduğunu Norveç'te 1944-1949 yılları arasında meydana gelen 4 ayrı gıda zehirlenmesi olayından sonra Steinar Hauge bildirmiştir. Vakalar incelendiğinde içerisinde vanilya bulunan bir sosun hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında bir gün bekletilmesinin sonucu zehirlenmeye sebep olduğu anlaşılmıştır. Steinar Hauge tarafından yapılan deneyde tamamen steril durumda olan vanilya tozlarını 10^5 kob/g *Bacillus cereus* kültürü ile kontamine etmiş ve 24 saat oda sıcaklığında bekletmiştir. *Bacillus cereus* ile kontamine vanilya tozu ile hazırlanan gıdaların tüketilmesinden ortalama 13 saat sonra deneklerde şiddetli karın ağrısı, ishal ve mide bulantısı gibi semptomların ortaya çıktığını ancak 8 saat gibi bir süre sonra spontan olarak ortadan kaybolduğunu bildirmiştir. Hauge tarafından yapılan bu deney sonucu *Bacillus cereus* 'un gıda zehirlenmesine sebep olabileceğini gösterilmiştir (Çöl,2014).

Daha sonra 1969 yılında Amerika Birleşik Devletleri' nde ilk *Bacillus cereus* kaynaklı gıda zehirlenmeleri rapor edilmiştir. 1970 yılına kadar meydana gelen gıda zehirlenmeleri sadece sulu diyare ile karakterize edilmiş ve semptomların gıdanın alınmasını takip eden 8-16 saat içerisinde ortaya çıktığı rapor edilmiştir. İngiltere'de 1971 yılında meydana gelen bir zehirlenme vakasında ise kusma ve mide bulantısı semptomları ile karakterize edilen yeni bir tür tespit edilmiştir. Çin restoranları ve take away restoranlarda satılan pirinçten kaynaklanan *Bacillus cereus*'un etiyolojiden sorumlu tutulduğu emetik tip gıda zehirlenmesi vakaları daha sonra, birçok Avrupa ülkesinden de bildirilmiştir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezine (CDC) *B. cereus* kaynaklı 1980 yılında 9, 1981 yılında da 8 gıda zehirlenme vakası bildirilmiştir (CDC,1981). Belçika'nın Brüksel kentinde meydana gelen ölüm ile sonuçlanan bir zehirlenme vakasında 20 yaşındaki bir bireyin bulantı- kusma belirtileri ile hastaneye başvurması sonucu, yediği yemeklerde yüksek seviyede *B. cereus* suşları ve emetik toksin olan Cereulide(14.8 µg / g) olduğu tespit edilmiştir (Naranjo ve ark.2011).

Tüm dünyada gıda zehirlenmelerine sebep olan bakteriler arasında *Salmonella* spp. 'den sonra en fazla *Bacillus cereus* gösterilmektedir. CDC (Cominicable Diseases Center: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi) 1998-2015

tarihleri arasında kesin olarak doğrulanmış 7385 olgunun yer aldığı 619 *Bacillus cereus* gıda zehirlenmesi salgını görüldüğünü, bu salgınlarda üç hastanın hayatını kaybettiğini bildiren bu raporda CDC kesin doğrulanmayan salgın sayısının 19.119 olduğunu bu salgınlardan 373.531 kişinin etkilendiğini ve hastalardan 337'sinin hayatını kaybettiğini bildirmiştir. Kanada' da 2006 yılında 36.000 kişide *Bacillus cereus* kökenli gıda zehirlenme vakası görülmüştür (May ve ark. 2016).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (Tebliğ No: 2010/8)'nde tahıl unları, pişirildikten sonra tüketime sunulan çözünen toz karışımları, bebek ve küçük çocuk ek gıdaları (özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar dahil) için belirlenen *Bacillus cereus* kriterleri Çizelge 1.3. de gösterilmiştir (Anonymous, 2010).

Çizelge 1.3. Türk Gıda Kodeksi *Bacillus cereus* Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği,

Özel beslenme amaçlı gıdalar					
Bebek formülleri ve devam formülleri	***B. Cereus***	2	5	$5x10^1$kob/g	$5x10^2$kob/g
(Özel Tıbbi amaçlı diyet gıdalar dahil)	*C.sakazakii*	10	0	0/25 g-ml	
	Salmonella	10	0	0/25 g-ml	
	L. Monocytogenes	10	0	0/25 g-ml	
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	***B.cereus***	5	2	10^2kob/g	10^3kob/g
(Özel Tıbbi amaçlı diyet gıdalar dahil)	*Enterobacteriaceae*	5	0	<10 kob/g	
	Salmonella	5	0	0/25 g-ml	
	L. Monocytogenes	5	0	0/25 g-ml	

4. Et suyu tabletleri, tozları, kuru formdaki çorbalar, çeşniler, krem şanti, soslar gibi toz ve tablet formdaki diğer gıda karışımları	Mikroorganizmalar	Numune alma planı		Limitler	
4.1. Doğrudan tüketime sunulan çözünen toz karışımlar	Enterobacteriacea	5	2	10^2	10^3
	Maya ve küf	5	2	10^2	10^3
	S. aureus ([4])	5	2	10^2	10^3
	B. cereus	5	2	10^2	10^3
	C. perfringens (sadece et içerenlerde)	5	2	10^2	10^3
	Salmonella spp.	5	0	0/25 g-mL	

Gıda yolu ile bulaşan patojen mikroorganizmaların gastrointestinal sistemde patoloji oluşturabilmeleri için, mikroorganizmaların sahip oldukları virülans faktörlerinin yanı sıra hastaya ait bilgilerin, hangi miktarlarda hangi gıdalar ile alındıkları da önemlidir. Gıdada 10^6 kob/g ve üstündeki miktarlarda *Bacillus cereus*' un bulunması ve bu gıdaların tüketilmesi gıda zehirlenmesine sebep olabilmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2010).

Bacillus cereus kaynaklı gıda zehirlenmesi insidansları ve, klinik formları ülkeden ülkeye ve suşdan suşa değişkenlik göstermektedir. Gıdaların hazırlanma ve pişirilme tekniklerinin farklı olmasının bu değişkenlikleri meydana getirebileceği öngörülmektedir (Çöl, 2014). Bu sebeple gıda zehirlenme vakaları ülkeden ülkeye farklı oranlarda görülmektedir. 2010 yılı Avrupa Birliği verilerine göre her ülkede 100.000 kişide %0.02 oranında görüldüğü rapor edilen *B.cereus* kaynaklı gıda zehirlenme oranı, 2011 yılındaki raporlara göre %0.04 oranına yükselmiştir (EFSA 2012; EFSA 2013).

Bacillus cereus suşları gıda zehirlenmesine sebep olan iki farklı tip enterotoksin sentezleyebilirler. Bu toksinler emetik (kusma) enterotoksin ve diyarejenik (ishal)enterotoksindir. Dolayısı ile klinik olarak iki tip zehirlenme tablosu ortaya çıkar. Bunlar; diyare yani ishal tipi ve emetik yani kusma tipi klinik tablolardır (Ünlütürk ve Turantaş, 2003).

Çizelge 1.4. *B. cereus* kaynaklı zehirlenmelerin tipik özellikleri (Granum ve Lindbäck 2013)

Özellikler	İshal Tipi (Diyare) Sendrom	Kusma Tipi (Emetik) Sendrom
Enfektif doz	10^5-10^7 hücre (toplam)	10^5-10^8 hücre (gıdaların gramında)
Toksinin üretildiği yer	Konakçının ince bağırsağı	Gıdada üremektedir.
Toksin tipi	Protein; enteretoksin(ler)	Siklik peptid; emetic toksin
İnkübasyon periyodu	8-16 saat (nadiren <24 saat)	0 ile 5 saat
Hastalığın süresi	12-24 saat (nadiren birkaç gün)	6 ile 24 saat
Semptomlar	Karın ağrısı, sulu diyare, arasıra mide bulantısı	Mide bulantısı, kusma, halsizlik (enteroksin oluşumuna bağlı bazen ishal)
Sıklıkla sorunlu gıdalar	Proteinden zengin gıdalar; et ürünleri, çorbalar, sebzeler, pudingler, soslar, süt ve süt ürünleri	Pastacılık ürünleri kızartılmış ve pişmiş pirinç, Makarna ve noodle

B.cereus'a toprak kökenli bir bakteri olmasından dolayı bahçe ve tarla ürünlerinde, sporlu bir bakteri olmasından dolayı ise ısıl işlem görmüş et ve süt ürünlerinde sıklıkla rastlanılmaktadır. *Bacillus cereus* kaynaklı gıda zehirlenmeleri sıklıkla pişmiş pirinç, et, sebze yemekleri, kümes hayvanları, çeşitli çorbalar, baharat, soslar, puding ve makarna gibi gıdaların tüketilmesiyle görülmektedir (Kalkan ve Halkman, 2006).

Bacillus cereus'un çiğ sütlere ahır ortamından ve sağım esnasında bulaşma ihtimali yüksektir (Ünlütürk ve Turantaş, 2003). Pastörizasyona dirençli olan *Bacillus cereus* sporlarının pastörizasyon sonrası da sütteki varlıkları devam edebilir (Altun, 2002). *Bacillus cereus*'un psikrotrof suşlarının kontamine ettikleri süt ve süt ürünlerinde soğukta saklanma sürecinde dahi toksin oluşturabilmesi, halk sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır (Özdemir,2003).

Bacillus cereus'un sebep olduğu gıda zehirlenmelerinde pirinç ve pirinç içerikli gıdaların yeri büyüktür. Pirinç üretiminde kullanılan yöntemler mikroorganizma yükünü etkilemektedir. Sulu arazide yapılan üretim bakteri sayısında artışa neden olmaktadır. Ayrıca tarlalara atık su ve sel sularının bulaşması bu sayıyı arttırmaktadır. Yetiştirilme tekniklerine göre kuru hasat yapılan pirinçlerden alınan örneklerde *Bacillus cereus* sayısının 10^2 kob/g gibi düşük değerlerde olduğu görülmüştür. (Gül, 2003).

Pirinç unu; tahıl unları grubu içerisinde yer alan ve işlem görmemiş pirincin içerisindeki kırık pirinç tanelerinden elde edilen önemli bir üründür. Birçok gıdada hammadde olarak kullanılan pirinç unu aynı zamanda yardımcı madde olarak da kullanılmaktadır. TS 2639 Pirinç Unu Standardı tanımında pirinç unu ‘’ince öğütülmüş, kaba kısımları elenerek ayrılmış bir pirinç mamulü" olarak geçmektedir. Pirincin kırık pirinç kısmında ve endosperminde bakterilere rastlanıldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Pirinç unu kırık pirinçten elde edildiği için bu durum oldukça önemlidir. Bu sebepten dolayı pirinç işleyicileri kırık pirinçte bulunan canlı koliformu ve bakteri sayılarını düşürmeye çalışmaktadırlar (Şahin, 2010).

Pirinç unu üretimi; hammadde (pirinç) temini, pirinç tanelerinin kabuğunun ayrıştırılması, fumigasyon ve havalandırma, kurutma (içerisinde bulunan nem oranını mikroorganizma kontrolü açısından azaltma) öğütme, eleme, paketleme, depolama ve pazarlama aşamalarını içermektedir (Anonymous, 2008).

Mikroorganizmalar tahıl unlarına, hammaddenin hasat edilmesinden önce tarlada, hasat sonrasında prosesin her aşamasında bulaşabilir. Yetiştirilme esnasında çevreden ve çalışanlardan bulaşabilecek olan mikroorganizmalar hasat veya hasadı takip eden diğer üretim aşamalarında ve çevreden bulaşabilmektedir. Hububat tanelerine öğütme işlemi uygulanmadan önce sırası ile tavlama, eleme ve havalandırma işlemleri uygulanmaktadır. Bu basamaklardan geçen hububat tanelerinin mikrobiyal yükünün azaltılmasına yönelik bazı işlemler uygulanmaktadır. Hububat taneleri içerisindeki sağlam olmayan taneleri ayırma

işlemi ve tavlama işlemi öncesinde hububatları klorlu su ile yıkamak, nemi azaltmak için kurutma aşamasında uygulanan ısıl işlem mikrobiyal yükü azaltmaya yönelik işlemlere örnek olarak verilebilir. Bunların yanında hijyen koşullarını her aşamada kontrol altında tutmak mikroorganizma kontaminasyonu açısından oldukça önemli bir yere sahiptir (Karapınar ve Gönül, 2003).

Bacillus cereus'un gıdaya bulaşmasını tamamen engellemek zordur. Fakat alınacak tedbirler ile patojen mikroorganizmanın daha fazla artması ve yayılması kontrol altına alınabilmektedir. Tedbirler arasında sterilizasyon yöntemi *Bacillus cereus* sporlarını kontrol etmekte en etkili yöntemdir. Isıya karşı oldukça fazla direnç gösteren *B.cereus* sayısının 3 dakika 105 ºC ısı uygulaması ile 5 log düzeyinde azaltıldığı gösterilmiştir (Karapınar ve Gönül, 2003). Bunun yanında pastörizasyon, tekrar ısıtma ve normal pişirme işlemleri bakteri sporlarını ortadan kaldırmak için yeterli değildir. Ancak pişirme işlemlerin ardından ürünlerin hızlı soğutulması ve ardından buzdolabı sıcaklığında saklama vejatatif hücrelerin çoğalmasını önleyebilmektedir (Çöl, 2014).

Pirinç unu birçok gıdanın üretiminde hammadde olarak kullanılmasının yanında teknik yardımcı madde olarak da kullanılmaktadır. Bebek mamaları, hazır toz formdaki pudingler, hazır toz formda çorbalar, bisküvi, bazı tatlılar, waffle, kek gibi birçok gıda bu grupta yer almaktadır (Şahin, 2010).

Hazır çorba kurutulmuş formdadır ve hububat, bakliyat unları, kurutulmuş et çeşitleri, kurutulmuş süt ürünleri baharat, tuz ve bitkisel yağ gibi maddelerin karışımından elde edilmektedir(Çoksaygılı ve Başoğlu, 2010).

Toz puding, Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde kabul edilen katkı maddeleri, yenilebilir nişasta ile lezzet ve çeşni verici maddelerin beyaz şeker ilave edilerek veya edilmeksizin karıştırılması ile hazırlanan bir mamuldür. Hazırlanmasında süt kullanılan hafif bir tatlıdır (TS 7998 1990).

Tahıl unları için mikroorganizmalar biyolojik tehlike ve tehdit olarak görüldüğünden risk analizlerinin ve değerlendirilmelerinin yapılması zorunlu hale getirilmiştir (Karapınar ve Gönül, 2003). ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim

Sistemi Belgesi içerisinde yer alan "HACCP Gıda Güvenlik Sistemi" çerçevesindeki talimatlar, sınırlamalar ve planlara göre pirinç unu üretim aşamaları uygulanmaktadır (Anonymous, 2008). Birçok gıdada hammadde veya teknik yardımcı madde olarak kullanılan pirinç ununun güvenli bir şekilde üretilip tüketiciye sunulması halk sağlığı açısından önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmada bebek, genç, yaşlı birçok kesimin beslenmesinde önemli bir yeri olan pirinç unu ve pirinç unu bazlı gıdalarda sıklıkla karşılaşılan ve insan sağlığı açısından tehlike oluşturan *B.cereus* bakterisinin varlığının saptanması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Chung ve Sun (1978), çalışmalarında 12 çiğ pirinç örneğini *Bacillus cereus* varlığı ve miktarı yönünden analize almıştır ve sonuç olarak 11'inde *Bacillus cereus*'a rastlamıştır. *Bacillus cereus* miktarının $2x10^2$ kob/g' dan daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Blakey ve Priestin (1980), fıstık, hububat ve fasulyeden oluşan gıda numunelerini *Bacillus cereus* varlığı yönünden analize almışlar ve toplam *B. cereus* sayısını $1x10^2$ -$8x10^4$ kob/g arasında bulmuşlardır.

Blakey ve Priest (1980), çalışmalarında 108 pirinç örneğinin 98'inde *Bacillus cereus* izole etmişlerdir.

Tuncer ve ark.(1987), yerli ve yabancı pirinç unlarını *Bacillus cereus* varlığı yönünden analize almışlardır. Örneklerin %18'in den *Bacillus cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

El-Sharbaany ve ark. (1989), yaptıkları çalışmada pişirilmiş pirinç ve pirinçli yemeklerden oluşan toplam 172 örneği analize almışlar ve %40'ında *Bacillus cereus* varlığını saptamışlardır. Tüm örneklerin %31'nin 10^3 kob/g'dan fazla *Bacillus cereus* içerdiğini bildirmişlerdir.

Mosso ve ark. (1989), hazır çorba, mısır unu, makarna, tatlı sos, salata sosu, süt ve süt ürünleri ve pirinç yemeklerini içeren toplam 102 adet gıda örneğinde *Bacillus cereus* varlığını araştırmışlardır. Sonuç olarak örneklerin hepsinden *Bacillus* spp. izole edilmiş ve *Bacillus cereus*'a 15 örnekte rastlandığı bildirilmiştir. *Bacillus cereus* izolatlarının 3'ü salata sosundan, 5'i toz çorba örneklerinden, 2'si süt ve süt ürünlerinden, 5'i ise tatlı soslardan izole edilmiştir.

Van Netten ve ark. (1990), Hollanda' da farklı gıda gruplarından oluşan 1700 adet numuneyi *Bacillus cereus* varlığı yönünden incelediği çalışmalarında en yüksek kontaminasyon oranının %42 ile baharatta olduğunu tespit etmişlerdir.

Aksu, 1994 yılında yapmış olduğu çalışmasında pastane ürünü, dondurulmuş gıda, konserve gıda, toz çorba karışımı, yemek örneklerinden oluşan

450 adet örneği *Bacillus cereus* varlığı yönünden analize almıştır. Çalışmasının sonucunda *Bacillus cereus*'a konserve gıda örneklerinin hiçbirinde rastlamamıştır. Ayrıca dondurulmuş gıda örneklerinin 2 tanesinde 10^2 kob/g düzeyinde, hazır çorba karışımı örneklerinin 15'inde 10^2 kob/g ve 1 tanesinde ise 10^3 kob/g düzeyinde *Bacillus cereus* tespit etmiştir. Pastane ürünlerinin 1 tanesinde 10^3 kob/g düzeyinde, 4 tanesinde ise 10^2 kob/g ve *Bacillus cereus* tespit etmiştir. 11 tane hazır yemek örneğinde 10^2 kob/g ve 5'in de 10^3 kob/g miktarlarda *Bacillus cereus* ~~tespit~~ izole edilmiştir.

Becker ve ark. (1994), *B. cereus* varlığını araştırdıkları çalışmalarında bebek ve çocuk maması örneklerinden en yüksek 10^2 kob/g *B. cereus* varlığı tespit etmişlerdir.

Te Giffel ve ark. (1996), Hollanda'da çeşitli satış noktalarından satın aldıkları süt, maya, un, makarna ürünleri, Çin yemekleri, kakao, çikolata, fırıncılık ürünleri, et ürünleri ve baharatlardan oluşan toplam 229 örneği *B.cereus* ve *B.subtilis* varlığı açısından incelemişlerdir. Analiz edilen bu örneklerin 109'unda *B.cereus,* 18'inde B.*subtilis,* 12'sinde ise *B.cereus* ve *B.subtilis'*in birlikte bulunduğu bildirilmiştir.

Harmon ve ark. (1997), çalışmalarında baklagil ve tahıl tohumlarını *Bacillus cereus* açısından analize almışlardır ve çalışmalarının sonucunda *Bacillus cereus'*u örneklerin %57'sinde tespit etmişlerdir.

Schiemann (1998), 65 ambalajlı gıda örneğinin Çin restoranlarından temin ederek *Bacillus cereus* varlığı yönünden analize almış ve örneklerin 28'inden *Bacillus cereus* izole ettiğini bildirmiştir ve örneklerden 20'sinin kızartılmış pirinç örneklerinden oluştuğunu ve analize alınan kızartılmış pirinç örneklerinin %33'ünde *Bacillus cereus* bulunduğunu bildirmiştir.

Wong ve ark. (1988) pastörize sütte %2, yumuşak peynirde %35, fermente sütte %17, dondurmada %52, süt tozunda %29 oranında *B. cereus* tespit etmişlerdir.

Var ve ark. (2003), Adana ilinde faaliyet gösteren pastane ve unlu mamullerden temin ettikleri 150 yaş pasta örneğinde, pasta örneklerinin yüzde 35.3'ünde 4- >1100 EMS g^{-1} arasında farklılık gösteren miktarlarda *Bacillus* sporu tespit etmişlerdir.

Tunç, 2004 yılında yaptığı çalışmada Tuzla, Pendik ve Gebze yöresinde bulunan çeşitli restoranlardan 40 adet pirinç pilavı numunesini *Bacillus cereus* varlığı yönünden incelemiş ve örneklerin % 7.5' inde *Bacillus cereus* saptamıştır.

Murindamombe ve ark (2005), Botswana'da 2001 ile 2002 yılları arasında sokak satıcılarından satın alınan gıda örneklerini *B. cereus* yönünden analiz etmişler ve gıdaların %65'inde en fazla $1.3x10^9$ kob/g miktarında *Bacillus cereus* bulunduğunu, gıdaların çoğunda ise *Bacillus cereus* miktarının tehlike oluşturacak miktarda olmadığını rapor etmişlerdir.

Meldrum ve ark.(2005), çalışmalarında 15.228 tüketime hazır gıdayı mikrobiyolojik yönden analize almışlar ve sonuç olarak örneklerin %0.5'inde *B. cereus*, *Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* izole etmişlerdir.

Rosenquist ve ark. (2005), analize aldıkları tüketime hazır 48.901 gıdada %98.7'sinde *Bacillus cereus* oranının 10^3 kob/g'dan düşük, sadece %0.5 oranındaki örnekte 10^4 kob/g seviyesinden yüksek bulmuşlardır. %0.5 oranında *Bacillus cereus* bulunan örneklerin ise nişastalı ve pişmiş gıda örneklerinden oluştuğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda *B. cereus*'un çiğ gıda örneklerinde de fazla miktarda bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Jang ve ark. (2006), çalışmalarında *B. cereus* grubundan olan bakterileri izole etmeyi amaçlamışladır ve 106 adet pirinç bazlı gıda örneğini analize almışlardır. Sonuç olarak örneklerin 42'sinden *B. cereus, B. thuringiensis* ve *B. mycoides* izole etmişlerdir. İzolatların %82'sinin *B. cereus* olduğunu göstermişlerdir.

Kamga ve ark. (2007), çalışmalarında Berlin'de bir anaokulunun gezisinden sonra geziye katılan yetişkin ve çocuklarda meydana gelen zehirlenme

olayını araştırmışlar ve bu kişilerin tükettikleri sütlaçta *Bacillus cereus* tespit etmişlerdir.

Ankolekar ve ark. (2009), çalışmalarında çeşitli marketlerden temin ettikleri 178 pirinç örneğinin 94'ünde *B.cereus* sporları varlığını bildirmişlerdir.

Park ve ark.(2009), test ettikleri 293 tahıl örneğinden 73'ünde (% 25), 63 pirinç örneğinde ise 23 örnekte (%37) *Bacillus cereus* izole etmişlerdir.

Akbulut (2010), çalışmasında 109 tüketime hazır günlük yemek örneği kullanmıştır ve 6 örnekte 10^2 - 10^3 kob/g aralığında, 3 farklı kırmızı et yemeğinden 10^1 -10^2 kob/g aralığında, *B. cereus* izole etmiştir. *B. cereus* pilav örneklerinin 23'ünde tespit edilemezken, 1 örnekte 10^2 -10^3 kob/g, diğer 1 örnekte ise 10^3 kob/g tespit edilmiştir.

Fangio ve ark. (2010), çalışmalarında içlerinde pirinç, patates, bal kabağı, buğday unu örneklerinden oluşan 45 adet gıdayı *Bacillus* spp. varlığı yönünden analize almışlardır. Balkabağı ve patates örneklerine ait izolatların %47.8'si, pirinç örneklerine ait izolatların %16.7'sı ve buğday unu örneklerine ait izolatların %15'i *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır.

Batchoun ve ark. (2011) Ürdün'de farklı restoranlardan ve marketlerden temin ettikleri 202 adet farklı gıda örneğinden 47 adedinde (% 23.3) *B. cereus* bakterisine rastlamışlardır.

Özarslan ve ark.(2015), Nevşehir, Aksaray, Niğde'de bulunan bazı okullara yemek hazırlayan bir firmanın yaptığı yemekten yiyen 406 öğrencinin kusma, titreme, baş dönmesi, gibi semptomlar ile sağlık kuruluşuna başvurmaları ile hastalığa sebep olan kaynaklar araştırılmıştırmışlardır. Sonuç olarak tüketilen kıymalı bezelye ve makarna numunelerinde $7x10^6$ kob/g *B. cereus* varlığı ile Stafilokokal enterotoksin tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Şenses ve ark. (2015), tüketime hazır çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesini araştırdıkları çalışmalarında, belirlenen limitlerin üzerinde olduğu tespit edilen *B. cereus*'un 14 adedi et ve sebze yemeklerinden, 2

adedi makarnadan, 1 adedi pilav numunelerinden izole edilmiştir. *B. cereus* sayısının 1 x 10^3 – 5.7 x 10^4 kob/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Soltan Dallal ve Heydari (2016), İran piyasasından toparladıkları 100 adet puding örneğini *Bacillus cereus* ve *Salmonella* varlığı bakımından incelemişlerdir. Örneklerden 7'sinde *Bacillus cereus* varlığı tespit edildiğini raporlamışlardır.

Acun, 2018 yılında İstanbul'da yemek üretimi yapan işletmelerden aldığı 100 adet gıda örneğini *Bacillus cereus* varlığı yönünden incelemiş ve 12 örnekte (15.2%) *Bacillus cereus* tespit etmiştir. Çorba örneklerinin analizlerinde 1adet sebze çorbasında 10^1 kob/ml, 1 adet şehriye çorbasında 6.3x10^1 kob/ml, 1 adet havuç çorbasında 7x10 kob/ml, 1adet mercimek çorbasında, 1.3x10^2 kob/ml, 1 adet mercimek çorbasında 2.6x10^3 kob/ml ve 1 adet arapaşı çorbasında 4.5x10^3 kob/ml *Bacillus cereus* tespit edilmiştir. Etli yemek örneklerinden 1 adet etli patates örneğinde 10^1 kob/g ve 1 adet islim köfte örneğinde 4x10^2 kob/g, etsiz yemeklerden 1 adet etsiz taze fasulyede de 1.1x10^2 kob/g izole edilmiştir. Pilav örneklerinde ise; 1 adet bulgur pilav örneğinde 3x10^1 kob/g, 48 pirinç pilavı örneğinde 10^1 kob/g tespit edilirken, 1 adet makarna örneğinde ise 5.2x10^4 kob/g saptanmıştır.

Ay ve ark.(2018), Colombia'da yaptıkları çalışmada farklı okulların yemekhanelerinden temin ettikleri toplam 497 pirinç ve nişastalı gıda örneğinin mikrobiyolojik kalitesini incelemişlerdir. Bacillus cereus'a gıdaların %9'un da rastlamışlardır.

Kim ve ark.(2018), Kore piyasasından temin edilen geleneksel bulanık pirinç şarabı örneklerinin mikrobiyal kalitesini belirlemek için yaptıkları çalışmada, *Bacillus cereus* 'u örneklerin % 58.1'inde tespit etmişlerdir ve miktarın düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Teramura ve ark.(2019), kızarmış pirinç, sade pirinç, kızarmış erişte ve patates salatasından oluşan gıda örnekleri ile yaptıkları çalışmada örneklerden ortalama 10^1- 10^3 kob/g aralığında *Bacillus cereus* izole edildiğini bildirmişlerdir.

Abdeen ve ark.(2020), çalışmalarında süt tozu ve peynirden oluşan gıda örneklerinden sırasıyla %9 ve %6.9 oranlarında *Bacillus cereus* izole ettiklerini ve multipleks PCR tekniği ile de toksin yapan genleri belirlediklerini bildirmişlerdir.

2.1. *B. cereus* Toksinleri ve Toksin Genlerinin Varlığı

İshal tipi zehirlenmeyi meydana getiren toksinler ısıya ve tripsine karşı duyarlı ekzoprotein ve onun kompleks bileşiklerinden oluşmaktadır. Bu tip zehirlenmeye sebep olan toksinler Hbl, Nhe CytK, *Bacillus cereus* eT ve Enterotoksin FM'dir (Choma ve Granum 2002). Diyare (ishal) tipi gıda zehirlenmesine sebep olan gıdalar arasında et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, çorbalar, sebzeler, pudingler bulunmaktadır. Diyare tipi (ishal) zehirlenmenin meydana gelmesinde Nhe, Hbl ve CtyK toksinlerinin daha fazla etkili olduğu düşünülmektedir. İshal tipi gıda zehirlenmelerinin oluşumunda kontamine gıda tüketildikten 6 ile 16 saat sonra karında ağrı, kramplar ve sulu ishal gibi semptomlar oluşmaktadır. Semptomlar ise 12 ile 24 saat içerisinde kendiliğinden geçmektedir. Genellikle ishal tipi zehirlenmeler *Clostridium perfringens'*e bağlı enterotoksemiler ile karıştırılır. Ancak ince bağırsakta sporulasyon esnasında enterotoksin üreten *Clostridium perfringens*'ten farklı olarak *B.cereus* ince bağırsakta vejetasyon süresince enterotoksin üretir. İshal tipi zehirlenmede *Bacillus cereus* ile kontamine olmuş gıdanın tüketilmesiyle beraber mideye geçen vejetatif hücre ya da sporlar buradan ince bağırsağa ulaşmaktadır. Enterotoksinler, incebağırsaklarda absorbsiyon-sekresyon (sıvı emilim) mekanizmasını bozarlar ve dolayısıyla lümende sıvı birikir ve sulu ishale neden olurlar. Diyare tipi (ishal tipi) hastalığın oluşumunda gerekli olan bakteri sayısını tespit için yapılan hayvan deneyli çalışmalarda kesin bir rakam belirlenememiştir (Pehlivanlar ve Şireli, 2003).

Cereulide toksini kusma tipi zehirlenmeyi meydana getiren *Bacillus cereus* toksinidir ve otoklavlamaya, yüksek ısıya, alkaliye karşı oldukça fazla direnç göstermektedir. Bu durum ise gıda işlenmesi sırasında emetik toksinin etkisinin

kaybolmamasına neden olmaktadır. Dolayısı ile Cereulide toksininin gıdalarda bulunması tüketiciler için önemli ölçüde risk oluşturmaktadır. Emetik toksin olan Cereulide ve diyajenerik toksin olan CytK *Bacillus cereus* tarafından oluşturulan toksinler arasında en güçlü olan toksinlerdir (Carlin ve ark., 2006). Gıda içerisinde *Bacillus cereus*'un çoğalmasına imkan veren şartlar ile Cereulide'nin çoğalma şartları kıyaslandığında basilin üremesi için optimal olan şartların altında dahi Cereulide toksinin üretilmeye devam ettiği gösterilmiştir. Optimum üreme sıcaklığı olan 37°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve 10°C' nin altındaki sıcaklıklarda Cereulide üretiminin sürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca anaerobik şartlarda Cereulide üretiminin sürdüğü yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir. Kusma tipi gıda zehirlenmesinin klinik bulguları ishalli tip zehirlenmenin prognozundan farklıdır. Gıda tüketilmeden, hazırlanma veya bekleme süresinde gıda içerisinde oluşan toksin kontamine gıda tüketildikten sonraki 0.5 ile 6 saat gibi kısa sürede etkisini mide bulantısı ve kusma gibi septomlarla göstermektedir. Çok sık olmamakla beraber karın ağrısı ve diyare de görülebilmektedir. Tipik bir gıda zehirlenmesi olan emetik formun belirtileri ortalama 24 saat içerisinde kendiliğinden kaybolmaktadır.(Finlay ve ark. 2000) (Pehlivanlar ve Şireli, 2003).

Jang ve ark. (2006), pirinç içerikli olan 106 adet gıda örneğinde ishal tipi zehirlenmeye yol açan Hbl, Nhe, BceT, ent FM ve CytK toksinlerin genlerini (hbl, nhe, becT, ent FM ve cytK) saptamışlardır.

Shaheen ve ark. (2006), *Bacillus cereus* toksinlerinden olan Cereulide'nin varlığını araştırmak üzere bebek maması örnekleri ile çalışmışlardır. Mamalarda başlangıçta *B. cereus*'u gramda 10^{5}' ten fazla tespit ederken oda sıcaklığında 24 saat beklettikten sonra ortalama 100 ml mamanın 2 ile 200µg arasında değişkenlik gösteren miktarda Cereulide toksini oluşturabileceğini göstermişlerdir.

Moravek ve ark. (2006), bebek mamasının da olduğu çeşitli gıdalardan elde edilen *B. cereus* izolatlarında toksin kodlayan gen varlığı ve toksin miktarının tespitine yönelik bir çalışma yapmışlar ve elde edilen izolatların 7 tanesinin tamamının ishal tipi gıda zehirlenmesine yol açan Nhe ve Hbl (sadece 1 tanesinin) genlerini bulundurduğunu tespit etmişlerdir.

Wijnands ve ark. (2006), pastane ürünleri, tatlandırıcılar, tüketime hazır gıdalar, sebze ve süt ürünlerinden oluşan çeşitli gıdalardan *B. cereus* izolasyonu yapmışlar ve Nhe, Cereulide(Ces), CytK, Hbl, toksin genlerinin varlığını araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda; bu genlerden Nhe %97'den fazla, Hbl yaklaşık %66, Ces %8.2, CytK % 50 miktarda izolatta tespit edilmiştir.

İmke (2007), çalışmasında 203 adet gıda örneği kulanmıştır ve bu gıdalarda *B. cereus* düzeyini ve toksin meydana getirebilecek gen varlığını araştırmıştır. Aynı zamanda emetik toksin üretme potansiyelindeki izolatların sitotoksisik etkisini incelemiştir. PCR çalışmalarında örneklerin %52'sinin Nhe geni, %2' sinin ise Ces geni, %46' sının ise Hbl ve Nhe genlerini bir arada içerdiğini saptamıştır. 82 adet pirinç örneğinin %50'sinde Nhe, %48'inde Hbl + Nhe, %1'inde ise Ces geni tespit etmiştir. İncelenen örneklerden 64 adedi bebek mamalarına aittir ve bunlardan 28'inin *B. cereus*' varlığı yönünden pozitif 26'sının ise negatif olduğu tespit edilmiştir. Pozitif saptanan örneklerin %72'sinde Nhe, %22'sininde Hbl+ Nhe, %3'ünde Ces geni tespit ederken, %3 oranında ise saptanabilir toksin tespit edememiştir. 18 adet tüketime hazır ticari gıdada pozitif tespit edilen 10 örneğin, %45'inin Nhe, %55'inin ise Hbl + Nhe genlerini bir arada içerdiğini saptamıştır.

Nduhiu ve ark (2009), çalışmalarında 31 adet haşlanmış pirinç örneğini *Bacillus cereus* varlığı ve toksin oluşturan gen varlığı yönünden analize almışlardır. Örneklerden izole edilen 51 adet *B. cereus* izolatına uygulanan PCR yöntemi ile toksin oluşturan gen varlığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak pirinç örneklerinde Nhe ve Hbl genleri, emetik toksin geni ve CytK geni varlığını bildirmişlerdir.

Bozkurt (2020), çiğ süt ile pastörize süt örneklerinden izole edilen *B. cereus*' un moleküler düzeyde tür tespitinin yapılması amacıyla IAC, 16S rRNA, NheA, NheB/NheC, HblC ve HblD gen bölgelerine spesifik yedi adet primer kullanılmıştır. Çalışma sonucunda incelenen 13 adet süt örneğinden sekizinde *Bacillus cereus* bakterisi moleküler olarak tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Pirinç unu

Bu çalışmada *Bacillus cereus* izolasyonu için Adana ilinde ambalajlanmış şekilde satışa sunulan 8 farklı firmanın çeşitli marketlerden satın alınan toplam 50 adet pirinç unu örneği ve pazar, aktar ve değirmenlerde dökme olarak satışa sunulan toplam 10 pirinç unu örneği ile çalışılmıştır. İki tekerrürlü olarak yürütülen bu çalışmada toplam 60 adet pirinç unu örneği analize alınmıştır.

3.1.2. Toz puding

Bu çalışmada *Bacillus cereus* izolasyonu için kullanılan farklı firmalara ait toz puding örnekleri Adana ilinde bulunan çeşitli marketlerden satın alınmıştır. Bu çalışmada toplam 34 adet toz puding kullanılmıştır.

3.1.3. Toz Çorba

Bu çalışmada *B.cereus* izolasyonu için kullanılan farklı firmalara ait toz çorba örnekleri Adana ilinde faaliyet gösteren çeşitli marketlerden satın alınmıştır. 4 markanın 3'er çeşidi olmak üzere toplam 24 toz çorba örneği ile çalışılmıştır.

3.1.4. Bebek Maması

Bu çalışmada *B.cereus* izolasyonu için kullanılan bebek maması örnekleri farklı markalardan ve çeşitleri ile satın alınmıştır. Toplam 74 adet bebek maması örneği ile çalışılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışılan gıda örneklerinin (ambalajlı pirinç unu, bebek maması, toz puding, toz çorba) ait olduğu firmalar, içerikleri ve alınan örnek sayıları

Ürün	Ürün Kodu	Marka	İçerik
Dökme Satılan Pirinç Unu	DSP1	Değirmen Pirinç Unu	Pirinç Unu
Bebek Maması	AK1	T	Bal, tahıl
Pirinç Unu	MDP1	H	Pirinç Unu
Pirinç Unu	DP6	A	Pirinç Unu
Bebek Maması	HB2	R	Süt, pirinç
Pirinç Unu	MDP3	H	Pirinç Unu
Pirinç Unu	K2	B	Pirinç Unu
Dökme Satılan Pirinç Unu	DSP1	Değirmen Pirinç Unu	Pirinç Unu
Pirinç Unu	KP4	C	Pirinç Unu
Bebek Maması	HB6	R	Süt, rezene, tahıl
Bebek Maması	HB11	R	Bal, irmik, süt
Pirinç Unu	MDP3	H	Pirinç Unu
Bebek Maması	AK1	T	Bal, tahıl
Bebek Maması	HB15	R	Süt, meyve, tahıl
Bebek Maması	HP4	U	Pirinç, tahıl
Bebek Maması	HB16	R	Süt, meyve, tahıl
Pirinç Unu	DP6	A	Pirinç Unu
Pirinç Unu	DP5	A	Pirinç Unu
Bebek Maması	HB6	R	Süt, rezene, tahıl
Bebek Maması	HP4	U	Pirinç, tahıl
Pirinç Unu	MDP1	H	Pirinç Unu
Bebek Maması	HP4	U	Pirinç, tahıl
Bebek Maması	HP4	U	Pirinç, tahıl
Bebek Maması	HB1	R	Süt, pirinç
Dökme Satılan Pirinç Unu	DSP2	Aktar Pirinç Unu	Pirinç Unu
Bebek Maması	HB12	R	Süt, bal, irmik
Pirinç Unu	DP5	A	Pirinç Unu
Bebek Maması	HB4	R	Süt, pirinç
Bebek Maması	HP4	U	Pirinç, tahıl
Bebek Maması	HB16	R	Süt, meyve
Pirinç Unu	DP6	A	Pirinç Unu
Bebek Maması	HB12	R	Süt, bal, irmik

Örnekler doğal ambalajlarında laboratuvara getirilerek aynı gün analize alınmıştır ve çalışmamız iki tekerrürlü yürütülmüştür. Çalışmaların izolasyon ve klasik tanımlama kısmı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarında, moleküler tanımlama kısmı ise Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.5. Besiyerleri ve Kimyasallar

Besiyeri ve kimyasal maddeler piyasadaki firmalardan temin edilmiştir. Kullanılan tüm katı ve sıvı besiyerleri uygulamadan hemen önce hazırlanmış ve taze olarak kullanılmıştır.

3.1.5.1. Egg Yolk Emulsiyon Sterille (Merck 103784)

Bacillus cereus analizinde kullanılan MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Agar (base) besiyeri için katkı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada; 121 ^{o}C de 15 dakika steril hale getirilen MYP Agar (base) içerisine 50 ml Egg Yolk Emulsiyon ilave edilmiştir (Merck, 2000).

3.1.5.2. *Bacillus cereus* Selective Supplement (Merck 109875)

Bacillus cereus analizinde kullanılan bu katkı refakatçi flora üzerinde inhibisyon etki sağlar. Her bir vial 1 ml steril saf su ile çözündürülerek kullanılmıştır (Merck, 2000).

3.1.5.3. MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Agar (base) (Merck 105267)

Bacillus cereus aranması ve sayımı için selektif katı besiyeri olarak kullanılır. Besiyerinin içeriğinde bulunan polimiksin refakatçi florayı baskılar. Hazırlanma aşamasında MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Agar (base) 500 ml hazırlandıktan sonra petrilere dökülür hale getirilir ve streril etmek için (121 ^{o}C de 15 dakika) otoklavlanır. Besiyeri dökme sıcaklığına ulaştığında içerisine 50 ml Egg Yolk Emulsiyon Sterille (Merck 1.03784.0001) ve 1 vial *Bacillus cereus*

Selective Supplement (Merck 1.09875) ilave edilerek petri kutularına dökülmüştür (Merck, 2000).

3.1.5.4. Peptone Water (Peptonlu Su) (Merck 107214)

Peptone Water ISO 6887 tarafından genel amaçlı bir seyreltme çözeltisi olarak önerilmektedir. Peptone Water istenilen miktarda distile su içerisinde çözündürülmüştür. Otoklavlanarak (121 ^{o}C de 15 dakika) steril hale getirilen seyreltme çözeltisi oda sıcaklığına ulaştığında kullanılmıştır.

3.1.5.5. Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458)

Tryptic Soy Agar bu çalışmada izole edilen ve yatık agarda muhafaza edilen suşların canlandırılıp biyokimyasal testlerinin yapılması amacı ile kullanılmıştır. Tryptic Soy Agar 20 g tartılarak 500 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. Otoklavlanarak (121 ^{o}C de 15 dakika) steril hale getirilen besiyeri dökme sıcaklığına ulaştığında steril petri kaplarına dökülmüştür (Merck, 2000).

3.1.5.6. Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459)

Tryptic Soy Broth bu çalışmada izole edilen ve yatık agarda muhafaza edilen suşların canlandırılıp biyokimyasal testlerinin yapılması amacı ile kullanılmıştır. Tryptic Soy Broth 15 g tartılarak 500 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. Tüpler içerisine 5 ml dağıtıldıktan sonra otoklavlanarak (121 ^{o}C de 15 dakika) steril hale getirilmiştir (Merck, 2000).

3.1.5.7. SIM Medium (Merck 1.05470)

Bu çalışmada hareketlilik testi için kullanılan dehidre besiyeri, 30 g/L olacak şekilde distile su ile hazırlanmıştır ve sürekli karıştırılarak kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak erimesi sağlanmıştır. Daha sonra standart tüplere 5'er ml dağıtılarak otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav

çıkışında tüpler dik konumda soğumaya bırakılmış ve besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak renkli olup 25°C'da pH'sı 7.2±0.2 olarak ayarlanmıştır (Merck, 2000).

3.1.6. Gram Boyama İçin Kullanılan Kimyasallar

a. Kristal Violet: Gram boyamada kullanılan ilk boya olan Kristal Violet için; 0.5 g boya tartılarak 100 ml damıtık su içinde çözündürüp kullanılmıştır (Temiz, 2000).
b. Lugol Çözeltisi: Gram boyamada kullanılan lugol çözeltisi içerisindeki iyot Gram pozitif bakterinin oldukça dayanıklı hücre duvarında bulunan çift katlı peptidoglukan yapı tarafından hapsedilir. Yıkama ile bu kompleksin akıp gitmesine izin verilmez (Anon, 2014-g). Lugol çözeltisi hazırlamak için 2 g potasyum iyodür (KI) kullanılmış ve 300 ml damıtık suda çözündürülmüştür. Bu çözeltiye daha sonra 1g iyice ezilmiş iyot kristali eklenmiş ve oda sıcaklığında tam çözünme sağlanıncaya kadar karıştırılmıştır (Temiz, 2000).
c. %96'lık Etil Alkol: Gram boyamada kullanılan etil alkol (Tekkim) piyasada ticari olarak satılan % 96'lık saflıkta temin edilmiştir.
d. Bazik Fuksin Çözeltisi: Bazik fuksin, 1 g fuksin (%90 boya içerikli) tartılarak 1000 ml distile suda çözündürülmesiyle elde edilmiştir. Ardından bu boya çözeltisinden 10 ml alınıp 100 ml damıtık suya karıştırılmasıyla sulu fuksin çözeltisi hazırlanmıştır (Temiz, 2000).

Nutrient Broth Besiyeri (Merck 1.05443)

Mikrobiyolojik analizlerde genel sıvı besiyeri olarak kullanılır. Bu çalışmada Jelatin Hidrolize testi için kullanılan dehidre besiyeri, 8.0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilip amaca uygun tüplere dağıtılmış ve 121 °C'da 15

dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkli olup, 25°C'da pH'sı 7.0±0.2'dir (Merck, 2000).

MR-VP Broth Besiyeri (Merck 1.05712)

Bu çalışmada metil red ve Voges Proskauer testleri için kullanılan dehidre besiyeri, 7.0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilip, standart deney tüplerine 5'er mL olarak dağıtılmış ve otoklavda 121°C 'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak, sarımsı kahve renkte olup, 25°C'da pH'sı 6,9±0,2'dir (Merk, 2000).

Simmons Citrate Agar Besiyeri (Merck 1.02501)

Bu çalışmada sitrat testi için kullanılan dehidre besiyeri, 22,3 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak (kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak) tam olarak eritilmiştir. Besiyeri henüz sıvı halde iken, standart 16 X 160 mm tüplere 7'şer mL olarak dağıtılıp, tüpler 121 ^{o}C'da 15 dakika sterilize edimiştir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde 2-2.5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renkte olup, 25 °C 'da pH'sı 6.6±0.2'dir (Merck, 2000).

3.1.7. Çözelti ve Solusyonlar

3.1.7.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

Moleküler tanımlamada DNA elektroforezi için kullanılan tampon TBE'nin hazırlanışı ve bileşenleri aşağıda verilmiştir.

TBE Stok Solusyonu	**10X**
Tris Base	121.1 g
Borik Asit	61.83g
EDTA	5.84 g

10X'lik TBE buffer stok solusyonu hazırlanmasında yukarıda verilen içerik distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanıp 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Ph 8.0 olarak ayarlanarak buzdolabında saklanmıştır.

TBE Kullanım Solusyonu	**1X**
10X TBE	100ml
dH_2O	900ml

1X TBE kullanım solusyonu hazırlanmasında stok solusyondan (10X) 100 ml alınıp 900 ml saf su ile karıştırılarak solusyon hazırlanmıştır.

3.1.7.2. 1 xTE Buffer

Moleküler tanımlamada çözücü kimyasal olarak kullanılan TE Buffer'ın bileşenleri ve hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

1 X TE Buffer Bileşenleri	**Miktar**
Tris – HCl (10Mm)	1.576g/lt
EDTA (1mM)	0.372g/lt
Tris – HCl (10Mm)	1.576g/lt

Hazırlanan 1xTE Buffer çözeltisinin pH 8.0' e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C' de 15 dk sterilize edilmiştir. Daha sonra 2ml'lik steril ependorflara 500 µl olacak biçimde dağıtılmış ve -20° C'de saklanmıştır.

3.1.7.3. PCR Buffer

Moleküler tanımlamada kullanılan PCR Buffer'ın bileşenleri ve hazırlanışı aşağıda anlatılmıştır.

10xPCR Buffer bileşenleri ve hazırlanışı:	
• KCl (500mM)	0.3728g/10ml
• TrisHCl (100mM)	0.1576g/10ml
• MgCl2 (15mM)	0.01429g/10ml
• Tween 20 (%0.5)	50µl

Yukarıda verilmiş olan oranlardaki bileşenler hassas terazide tartılarak 10ml ultra-saf suda çözündürülmüştür. Daha sonra çözelti pH 8.3' e ayarlanmıştır. Hazırlanan 10xPCR Buffer 100ml ultra-saf su eklenerek 1x yoğunluğuna getirilmiş ve 2ml' lik steril ependorflara her bir ependorfta 500µl olacak biçimde dağıtılmıştır. Kullanılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.1.7.4. Tris (1M)

121g Tris Base 800 ml distile suda eritildikten sonra içerisine yaklaşık 60 ml HCl asit ilave edilmiştir. pH:7.6 ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştrir.

3.1.7.5. %2 'lik Agaroz jel

%2'lik Agaroz jel hazırlanmasında 2 g agaroz jel tartılmış ve üzerine 100 ml TBE tampon eklenip eritme işlemi mikrodalgada çözülme gerçekleşene kadar ara ara karıştırılarak yapılmıştır.

3.1.8. PCR Uygulaması

PCR işlemi Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler cihazında yapılmıştır.

3.1.8.1. Primerler

Biyokimyasal identifikasyon sonucu *Bacillus cereus* genusuna ait olduğu doğrulanan 2 suşun PCR ile tanımlanmasında kullanılan primerler Çizelge 3.5.'de elde edilen 32 izolatın aralarındaki klonal ilişkiyi belirlemek için uygulanan RAPD-PCR yönteminde kullanılan primerler ise Çizelge 3.6.' da verilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR işleminde kullanılan primerler

BCFomp1	***BCRomp1***
5'-ATCGCCTCGTTGGATGACGA- 3'	**5'-CTGCATATCCTACCGCAGCTA-3'**

Çizelge 3.3. RAPD-PCR işleminde kullanılan primerler

***Bacillus cereus* forward**	***Bacillus cereus* reverse**
5`CCGAGTCCA 3`	**5'CCGGCGGCG 3 '**

3.1.8.2. Elektroforez

Elektroforez işlemi Thermo marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi ise Cleaver (nano PAC-300P) marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.1.8.3. Marker

Bacillus cereus tanımlaması için marker olarak 50 bp'lik DNA ladder (Thermo) kullanılmıştır.

3.1.8.4. Ethidium Bromid

Yapılan elektroforez işleminden sonra görüntüleme yapmak için jelin boyanmasında kullanılmış olan %1'lik Ethidium Bromid (Sigma) 500 ml 1X TBE ile hazırlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Gıda Örneklerinden *Bacillus cereus* İzolasyonu

Bacillus cereus' un gıda örneklerinden izolasyonu ve koloni sayımı için en sık kullanılan besiyeri selektif Mannitol Egg Yolk Polymixine(MYP) Agar'dır. Bu besiyerine ilave edilen polimiksin, diğer refakatçı bakterileri baskılar. Mannitol'ü fermente edemeyen *B. cereus* bu besiyerinin rengini bozmaz ve pembe renkli koloni oluşturur ve flora içerisindeki mannitolü kullanabilen mikroorganizmalar oluşan asit sebebi ile besiyerinin pH'sını düşürür ve buna bağlı olarak sarı/açık pembe renkte koloniler oluşturur. Bu sebeple besiyeri selektif bir besiyeri olma özelliği taşır. Besiyeri bileşiminde bulunan yumurta sarısı ise *Bacillus cereus* 'un lesitinaz aktivitesi ile belirlenmesini sağlar. *Bacillus cereus* lesitinaz pozitif özelliğe sahip olduğundan kolonileri etrafında beyaz bir presipitasyon oluşturur. Genellikle bu reaksiyon *Bacillus cereus* izolatlarının çoğunda 18 saat gibi kısa bir süre içinde gözlemlenir (Kaleli ve Özkaya,2000)

Çalışılan gıda örneklerinden *Bacillus cereus* izolasyonu FDA (Food and Drug Administration) resmi internet sitesinde Ocak 2012 yılı verilerine göre BAM (Bacteriological Analytical Manual) bölüm 14' de yayımlanan "Gıdadan *Bacillus cereus* İzolasyonu" bölümünden yararlanılarak yapılmıştır. Analize alınan örnekler 10 g tartıldıktan sonra ön zenginleştirme amaçlı 90 ml peptonlu su (Merck) içeren erlenler içerisinde homojen hale getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış örneklerden 1 ml alınarak 90 mm çapında içerisinde MYPA içeren petrilere yayma ekim yapılmış ve daha sonra 30 ^{o}C de 16 saat süre inkübasyona bırakılmıştır (FDA, 2012).

3.2.2. İzole Edilen Şüpheli Kolonilerin Tanımlanması

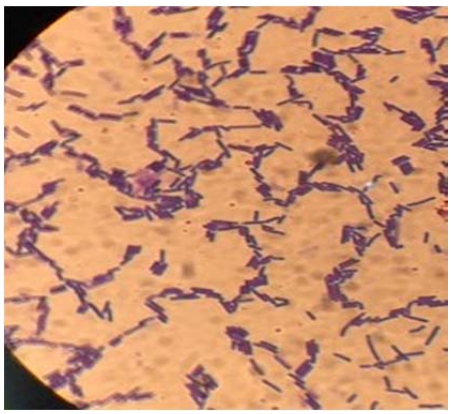
3.2.2.1. Morfolojik Tanımlama

3.2.2.1.(1). Bakteri Koloni Morfolojisinin İncelenmesi

İnkübasyon sonunda petri kaplarındaki şüpheli *Bacillus cereus* 'ların koloni görünümleri incelenmiştir ve petri kaplarında oluşan tipik (kırmızı renkli, zonlu) koloniler *Bacillus cereus* şüpheli olarak değerlendirilmiştir ve diğer farklı koloniler de izole edilerek ileri tanımlama testlerine tabi tutulmuştur. Koloni görünümleri istenilen özelliklere sahip olan ve olmayan kolonilerin hücre morfolojilerini incelemek için gram boyama yapılmıştır (Merk, 2000)

3.2.2.1.(2). Bakteri Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Gram Boyama: Şüpeli koloni öze yardımıyla alınıp temiz bir lam üzerine yayılmış, kuruduktan sonra bek alevi üzerinde 3 kez geçirilerek fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. İlk aşamada lam üzerine birkaç damla kristal violet damlatılıp 1 dakika boyunca bekletilmiştir ve sonra saf su ile yıkanmıştır. İkinci aşamada lam üzerine birkaç damla lugol çözeltisi damlatılıp 1 dakika beklenip saf su ile yıkanmıştır. Üçüncü aşamada ise lam 15 saniye boyunca etil alkolde bekletilip saf su ile yıkanmıştır. Son aşama olarak lam üzerine bazik fuksin çözeltisi damlatılıp 15 saniye boyunca bekletilmiş ve saf su ile yıkanmıştır. Kuruyan lamlar üzerine immersiyon yağı damlatılıp 100' lük objektif altında incelenmiştir. Gram pozitif ve çubuk şekilli bakteriler *Bacillus cereus* şüpheli olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Şüpheli *Bacillus cereus* 'ların mikroskop görüntüsü

Hareket Testi: Yumuşak olarak hazırlanmış SIM medium içeren tüplere iğne uçlu öze ile şüpheli *Bacillus cereus* kolonilerinden 5 ml alınıp ekim yapılmıştır. 18-24 saat süre ile 37 °C'de inkübasyona bırakılmış örnekler inkübasyonun sonunda değerlendirmeye alınmıştır. İnökülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış, şemsiye görünümlü bulanıklık bakterinin hareketliliğinin pozitif olduğunu göstermiştir (Merck, 2000).

3.2.2.2. Biyokimyasal Tanımlama

Morfolojik olarak şüpheli *Bacillus cereus* kolonilerine ve diğer kolonilere biyokimyasal testler uygulanmıştır.

3.2.2.2.(1). İndol Testi

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılmaktadır. Şüpheli koloniler 5 ml Tryptic Soy Broth bulunan tüplere ekildikten sonra 24 saat 30 ^{o}C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir tüpe 2-3 damla Kovacks ayracı damlatılmış ve besiyeri üzerinde kırmızı halka oluşan tüpler indol pozitif olarak kabul edilmiştir (Merk, 2000).

3.2.2.2.(2). Katalaz Testi

MYP Agar'da gelişen şüpheli koloniler öze yardımı ile alınarak bir lam üzerine yayılmış üzerine 1-2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumunun gözlenmesi halinde test sonucu pozitif kabul edilmiştir (Merck, 2000).

3.2.2.2.(3). Oksidaz Testi

Bu test hem oksidaz kiti (Bactident Oxidase, Merck) hem de oksidaz ayracı birlikte kullanılarak uygulanmıştır. Oksidaz ayracı aşağıda verilmiş olan miktarlarda tetrametil-1,4-fenilendiamin (Merck) ve distile suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Manual olarak hazırlanmış oksidaz ayracı ışıktan korunacak biçimde +4^{o}C' de buzdolabında saklanmıştır.

Oksidaz ayracının hazırlanışı:

- Distile su 10 mL
- Tetrametil-1,4-fenilendiamin 0.1 g

İzole edilen kolonilerin oksidaz reaksiyonlarını test ermek amacı ile filtre kağıtları dikdörtgen şeritler halinde kesilip sterilize edilmiştir. Her oksidaz testi için steril olan yeni bir şerit kullanılmıştır. Önceden bantlar halinde kesilip, sterilize edilmiş filtre kağıtları temiz lamın üzerine konulmuştur. Filtre kâğıdının üzerine 2-3 damla oksidaz ayıracı damlatılmış ve besiyerinden plastik öze yardımı ile alınan şüpheli koloni, filtre kağıdı üzerindeki ayıracın damlatıldığı bölgeye sürülmüştür. Filtre kâğıdındaki sürüntü bölgesinde 5 -15 saniye içinde mor renk oluşumunun gözlenmesi halinde oksidaz testi pozitif olarak kabul edilmiştir. Oksidaz testi negatif veren koloniler, renk değişimi gözlenmeyen koloniler *Bacillus cereus* olarak şüphelenilmiştir (Anonim, 2005b).

3.2.2.2.(4). Jelatin Hidrolize Testi

Bu test için; %10 -15 jelatin içerecek şekilde tüpte hazırlanan Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır (pH 7.2). Hazırlığı tamamlanan tüpler otoklavda 115 ° C' da 20 dakika steril edildikten sonra dik vaziyette soğumaya (katılaşmaya) bırakılmıştır. İncelenecek kültürden, tüpteki besiyerine saplama ekim yapılmıştır. Kontrol olarak ekim yapılmamış bir besiyeri de incelemeye dahil edilmiştir. Tüpler 20 -25° C'de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır ve kontrol tüpündeki besiyeri ile kıyaslama yapılmış ve sıvılaşma olan besiyerleri pozitif olarak kabul edilmiştir (Merck, 2000).

3.2.2.2.(5). Voges Proskauer(VP) testi

Bu test, bazı mikroorganizmaların glukozu fermente ederek, nötral bir ürün olan acetylmethylcarbinol'u (acetoin) oluşturup oluşturmadığını belirlemede kullanılır.

Aktif kültürler 5'er mL steril MR-VP Broth (Merck 1.05712) besiyerine aktarılmış ve tüpler 48 saat 30°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir kültürden VP testinin yapılması amacı ile ayrı tüplere 1'er mL alınmıştır. Bu tüplerin üzerine önce 0.6 mL α–naftol, sonra da 0,2 mL %40'lık KOH çözeltisi ilave edilmiş hafif çalkalanıp 4 saat beklendikten sonra kiraz kırmızısı renk oluşumu gözlenen tüplerdeki suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000).

3.2.2.2.(6). Metil Red (MR) Testi

Bu test bazı mikroorganizmaların glukozu fermente ederek besiyerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır.

MR-VP Broth (Merck 1.05712) besiyerine aktarılmış aktif kültürler 30°C sıcaklıkta 48 saat inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda tüplere pastör

pipeti ile 4 damla kadar metil red indikatörü damlatılmıştır. Sarıdan kırmızıya dönen tüplerdeki izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000).

3.2.2.2.(7). Sitrat Testi

Bu test, mikroorganizmaların, besi yerlerine katılan sitratı karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada, bakteri cins ve türlerini identifikasyonda kullanılır (Temiz, 2000).

Bu amaçla izolatların Simmon's Sitrat agar'a (Merck 102501) ekimleri yapılmış, 2-7 gün süre inkübe edilmiştir. Üreme ve mavi renk değerlendirilmiştir. (Temiz 2000).

3.2.2.3. Moleküler Tanımlama

3.2.2.3.(1). Dondur Çöz Yöntemi ile Kolonilerden DNA İzolasyonu

Koloni örneklerinden DNA izolasyon işlemi, dondur çöz yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem aşağıdaki işlem basamaklarına göre yapılmıştır.

1. Derin dondurucuda -20°C'de saklanan örnekler vakit kaybetmeden ısı bloğuna alınmış ve 95 °C'de 5 dk süre ile kaynatılmıştır.
2. Kaynatma işleminin ardından örnekler -20°C'de 1 – 2 saat süre tutularak yeniden dondurulmuştur.
3. Yukarıdaki işlemler 2 kez daha tekrarlanmıştır.
4. En son kaynatma işleminin ardından örnekler 13.000rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonunda oluşan supernatant yeni ependorf tüpüne aktarılmıştır.
6. Spektrofotometrede DNA sayımı yapılmış ve örnekler kalıp DNA olarak PCR ile amplifikasyon işleminde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2.3.(2). motB gen bölgesinin PCR amplifikasyonu

Çalışmamızda *Bacillus cereus* suşlarının moleküler temelli PCR amplifikasyon yöntemi ile gösterilmesi amacıyla, bir dış zar proteini (OmpA) olarak sınıflandırılan flagellar motor protein MotB'yi kodlayan *motB* gen bölgesi, hedef gen bölgesi olarak kullanılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinden 575 bp'lik *motB* gen bölgesinin PCR ile tespiti, dizisi aşağıda belirtilen spesifik BCFomp1 /BCRomp1 primer çifti ve PCR şartları kullanılarak Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler da gerçekleştirilmiştir.

BCFomp1	***BCRomp1***
5'-ATCGCCTCGTTGGATGACGA- 3'	**5'-CTGCATATCCTACCGCAGCTA-3'**

94 ° C (5 dak.)
94 ° C (30 saniye);
54.5 ° C (1 dak); } 30 döngü
72 ° C (1 dak);
72 ° C (7 dak);

Amplifikasyon için toplam hacmi 25µl olan PCR hazırlanmıştır ve hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

-Taq DNA Polymerase 2X Master Mix	12.5 µl
- dH_2O	6 µl
- Her Primerden (25pmol)	0,25 µl
-DMSO (Dimetil sülfoksit)	1µl
- Kalıp DNA	50ng/5µl

575 bp'lik amplikon varlığını araştırmada kullanılan jel elektroforez yönteminde (Cleaver; nano PAC300P) moleküler ağırlık markörü olarak 50 bp'lik DNA ladder'den 5 µl ve amplikonlardan 10 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiştir ve %2'lik agarose jel için elektroforez cihazında TBE tamponu kullanılarak 110 Voltaj'da 1 saat yürütülmüştür. İşlem tamamlandıktan sonra %1'lik Ethidium Bromid (Sigma) içeren 500 ml 1X TBE ile 15 dakika boyunca boyanmıştır ve fragmanlar UV ışığı kullanılarak görselleştirilmiştir (Oliveira ve ark. 2002)

3.2.2.3.(3). RAPD-PCR amplifikasyonu

Amplifikasyon için toplam hacmi 25µl olan PCR hazırlanmıştır ve hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

-Taq DNA Polymerase 2X Master Mix	12.5 µl
- dH_2O	6 µl
- Her Primerden (25pmol)	0,25 µl
-DMSO (Dimetil sülfoksit)	1µl
- Kalıp DNA	50ng/5µl

Numunelerin işlenmesi için amplifikasyon koşulları aşağıdaki gibidir:

94 ° C (3 dak.)
94 ° C (45 saniye);
30 ° C (2 dak); — 4 döngü
72 ° C (1 dakika);
94 ° C (45 saniye);
36 ° C (1 dakika); — 26 döngü
72 ° C (2 dakika)
75 ° C (10 dakika)

+4°C'de numunelerin soğumaya hazır hale gelene kadar soğutulması sağlanmıştır. Reaksiyonlar, termal bir cycler modeli olan Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler da gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyon ürünlerinin elektroforezlerinde (Cleaver; nano PAC300P) moleküler ağırlık markörü olarak 50 bp'lik DNA ladder'den 5 µl ve amplikonlardan 10 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiştir ve %2'lik agarose jel için elektroforez cihazında TBE tamponu kullanılarak 110 Voltaj'da 1 saat yürütülmüştür. İşlem tamamlandıktan sonra %1'lik Ethidium Bromid (Sigma) içeren 500 ml 1X TBE ile 15 dakika boyunca boyanmıştır ve fragmanlar UV ışığı kullanılarak görselleştirilmiştir (Oliveira ve ark. 2002).

Elektroforezi yapılan amplikonlar KODAK Görüntüleme Sisteminde görüntülenerek tiff formatında kaydedilmiş, elde edilen bant görüntüleri Gel Compare programı kullanılarak UPGMA analizi ile değerlendirilmiştir.

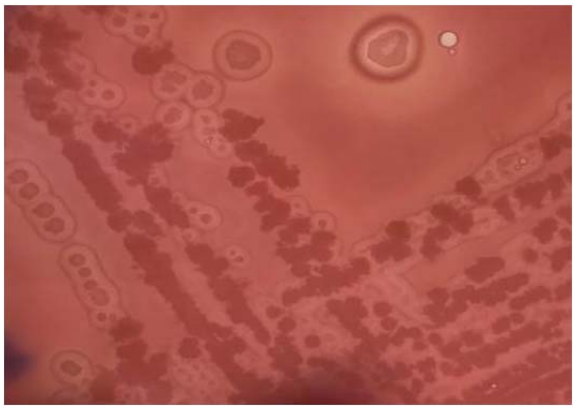
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Gıda Örneklerinden *Bacillus cereus* İzolasyonu ve Tanımlanması

Araştırma kapsamında 2 tekerrürlü olarak çalışılan toplam 192 adet gıda (pirinç unu, hazır çorba, puding, bebek maması) örneği *Bacillus cereus* varlığı açısından incelenmiştir.

4.1.1. Şüpheli *Bacillus cereus* 'ların Koloni Morfolojileri

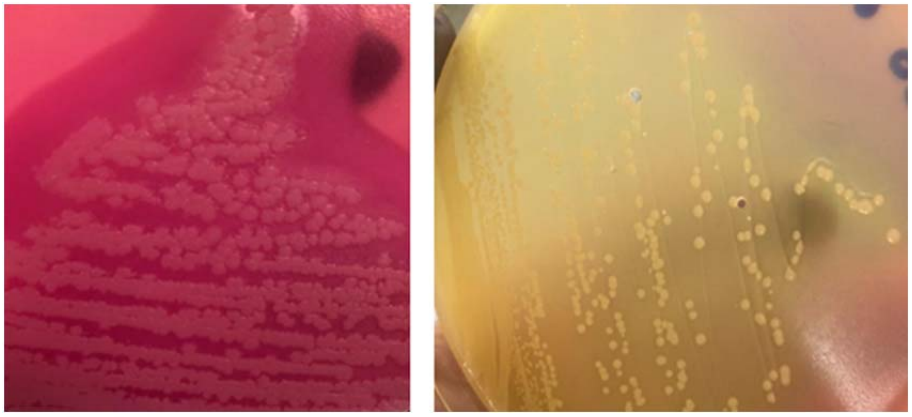
Çalışmada seçici katı besiyeri olarak MYPA (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) kullanılmıştır**.** Besiyerinde 5 mm çapında pembe renkli, çökelti oluşturan koloniler şüpheli *Bacillus cereus* olarak değerlendirmeye alınmıştır. Şekil 4.1.'de MYP Agar'da görülen şüpheli *Bacillus cereus* kolonileri gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Bacillus cereus* Şüpheli Kolonilerinin MYP Agar'da Görüntüsü

4.1.2. Tipik *Bacillus cereus* Kolonilerinden Farklı Olan Kolonilerin Morfolojisi

Çalışmada tipik *Bacillus cereus* kolonilerinin dışında da kolonilere rastlanmıştır. Koloni morfolojilerine göre *Bacillus cereus* olarak tanımlanamayan bu kolonilerin gram reaksiyonlarına bakılmış ve daha sonra biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Şekil 4.2.' de gelişen farklı koloniler verilmiştir.



Şekil 4.2. MYP Agar' da Gelişen Farklı Kolonilerin Görüntüsü

Bu araştırmada incelenen 192 gıda örneğinden (hazır toz çorba pirinç unu, , puding ve bebek maması) izole edilen şüpheli *Bacillus cereus* izolatları ile diğer izolatların örnek dağılımı Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışılan Gıda Örneklerinden İzole edilen şüpheli *Bacillus cereus* izolatları ile diğer izolatların kaynak ve sayısı

Örnekler	**İzolat elde edilen örnek Sayısı**	**Şüpheli *Bacillus cereus* izole edilen örnek sayısı**	**Farklı izolatların elde edildiği örnek sayısı**	**Örnek Sayısı**
Ambalajlı pirinç unu	12 örnek	3	9	50
Açık pirinç unu	2 örnek	1	1	10
Toz Puding	-	-	-	34
Toz çorba	-	-	-	24
Bebek maması	18 örnek	6	12	74
Toplam	32 örnek	10	22	192

+: Pozitif, -: Negatif

Çizelge 4.2. *Bacillus cereus'*dan Farklı Koloni Özelliği gösteren izolatlar

Bebek Maması	AK1	*P.aeruginosa*
Pirinç Unu	MDP1	*B.subtilis*
Pirinç Unu	DP6	*B.subtilis*
Bebek Maması	HB2	*Proteus miribalis*
Pirinç Unu	MDP3	*Bacillus cereus*
Pirinç Unu	K2	*B.subtilis*
Dökme Satılan Pirinç Unu	DSP1	*B.subtilis*
Pirinç Unu	KP4	*B.subtilis*
Bebek Maması	HB6	*B.subtilis*
Bebek Maması	HB11	*B.subtilis*
Pirinç Unu	MDP3	*B.subtilis*
Bebek Maması	AK1	*P aeruginosa*
Bebek Maması	HB15	*E.coli*
Bebek Maması	HB16	*E.coli*
Pirinç Unu	DP5	*B.subtilis*
Bebek Maması	HP4	*B.subtilis*
Pirinç Unu	MDP1	*B.subtilis*
Bebek Maması	HP4	*B.subtilis*
Dökme Satılan Pirinç Unu	DSP2	*B.subtilis*
Bebek Maması	HB12	*Proteus miribalis*
Pirinç Unu	DP5	*E.coli*
Bebek Maması	HB4	*E.coli*
Bebek Maması	HB12	*B. subtilis*

Çizelge 4.3. Şüpheli *Bacillus cereus* İzole Edilen Örnekler ve Kodları

Ürün	Ürün Kodu	Mikroorganizma
Dökme Satılan Pirinç Unu	DSP1	*Bacillus cereus*
Bebek Maması	HP4	*Bacillus cereus*
Pirinç Unu	DP6	*Bacillus cereus*
Bebek Maması	HB6	*Bacillus cereus*
Bebek Maması	HP4	*Bacillus cereus*
Bebek Maması	HB1	*Bacillus cereus*
Bebek Maması	HP4	*Bacillus cereus*
Bebek Maması	HB16	*Bacillus cereus*
Pirinç Unu	MDP3	*Bacillus cereus*
Pirinç Unu	DP6	*Bacillus cereus*

Çalışılan toplam 192 adet örneğin 18'in de üreme görülmüştür. Bu 18 örneğin 2'sini DSP1 ve DSP2 kodlu dökme satılan pirinç unu örneklerinden, 4'ünün bebek maması ve 12'sinin ambalajlı pirinç unu örneklerinden olduğu görülmüştür. Toplam 18 örneğin MYPA'da verdiği 32 koloni seçilerek tek koloni düşürülmüştür ve koloniler incelenmiştir.

Bu koloniler değerlendirildiğinde şüpheli 10 koloniye (pembe ve çökeltili) rastlanmıştır (DSP1, MDP3, HP4, DP6, HB6, HP4, HB1, HP4, HB16, DP6). *Bacillus cereus* olmayan farklı 22 koloniye rastlanmıştır ve bu kolonilerin pembe çökeltisiz,pembe/sarı,sarı(BM4,MDP1,AK1,DP6,HB2,K2,DSP1,KP4,HB6,HB11, MDP3, HB4, DP5). Pembe çökeltili koloniler şüpheli *Bacillus cereus* olarak değerlendirilmiştir. Diğer kolonilerinde tanımlamalarını yapmak için tüm izolatlara gram boyama ve biyokimyasal testler uygulanmıştır.

Çalışmamızda *Bacillus cereus* şüpheli kolonilere ve farklı kolonilere pirinç unu ve bebek maması örneklerinde rastlanırken, toz çorba ve toz puding örneklerinde hiçbir mikroorganizma üremesi görülmemiştir. Juan ve ark. (2006) ise çalışmalarında içlerinde puding örnekleri de yer alan 381 kurutulmuş süt ürünü kullanmışlardır. Bu çalışmada analize aldıkları 381 gıda örneğinin 175 'inde *Bacillus cereus* varlığını tespit etmişlerdir. İzolatların 8'inin puding

numunelerinden olduğunu bildirmişlerdir. Her ne kadar bizm çalışmamızda puding örneklerinde *Bacillus cereus* varlığı tespit edilememişse de Juan ve ark. larının çalışmaları ile bu ürünlerin de bu bakteri ile kirli olabileceği görülmektedir.

Bir başka çalışmada ise; Aksu (1994) ülkemizde satışa sunulan farklı gruptan hazır gıda örneklerinde *Bacillus cereus* 'un varlığını araştırmıştır. Aksu, çalışmasında yer alan 86 hazır toz çorba örneğinin 16'sında *Bacillus cereus* izole ederken 10 toz pudingin hiçbirinde *Bacillus cereus* izole edemediğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da toz puding örnekleri ve bunun yanısıra toz çorba örnekleri temiz çıkarken, Aksu ve ark. larının çalışmasında aksine toz çorba örnekleri *Bacillus cereus* açısından kirli bulunmuştur.

Hardog ve arkadaşları 1978 yılında Hollanda'da yapmış oldukları çalışmada 455 adet günlük tüketilen tatlı örneklerinin mikrobiyolojik analizini yapmışlardır. 455 adet gıda örneğinin 61'i krema, 311'i puding, 21'i mauses, 34' ü karamel ve 28'i farklı tatlılardan oluşmaktadır. Sonuç olarak fabrikada üretilen sütlü tatlılarda mikrobiyolojik kontaminasyonun diğerlerine göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

İzmir piyasasında yer alan market ve pazarlardan temin edilen, paketlenmiş ve paketlenmemiş şekilde satılan çeşitli kuru gıdaları *Bacillus cereus* açısından kalitelerini ortaya koymak amacıyla 100 farklı örneği analize almışlardır. Analize alınan örneklerden hazır toz çorbalara örneklerinin birkaçından *Bacillus cereus* izole edilmiştir (Filiz, 2001) Bizim çalışmamızda ise toz çorba örnekleri temiz çıkarken Filiz'in çalışmasında aksine toz çorba örnekleri *Bacillus cereus* açısından kirli bulunmuştur.

4.1.3. Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Hücre Morfolojileri

Örneklerden elde edilen izolatların tamamına hücre morfolojilerinin belirlenmesi amacı ile gram boyama yapılmıştır. Şüpheli 10 *Bacillus cereus* izolatının gram boyanması sonucunda tamamının gram pozitif ve basil olduğu görülmüştür. İzolatlar ileri tanımlama testlerine tabi tutulmuştur.

4.1.4. Gıda Örneklerinden İzole Edilen Diğer İzolatların Hücre Morfolojileri

Şüpheli *Bacillus cereus* kolonileri haricinde elde edilen diğer 22 izolatın 8'inin gram (-) basil, 14'ünün gram (+) basil olduğu görülmüştür ve izolatlar ileri tanımlama testlerine tabi tutulmuştur.

4.2. Şüpheli İzolatların Biyokimyasal Tanımlaması

Gıda örneklerinden klasik kültürel yöntem ile elde edilen izolatlara biyokimyasal tanımlama uygulanmış ve test sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışılan Örneklerden Elde Edilen İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları

	Katalaz	İndol	Oksidaz	Jelatin Hidrolize	Metil Red	Voges Proskauer	Sitrat
DSP1	+	-	-	-	-	+	+
AK1	+	-	+	+	-	-	+
MDP1	+	-	+	+	-	+	+
DP6	+	-	-	+	+	+	+
HB2	+	-	-	+	-	+	+
MDP3	+	-	-	-	-	+	+
K2	+	-	+	+	-	+	+
DSP1	+	-	belirsiz	+	-	+	+
KP4	+	-	belirsiz	+	-	+	+
HB6	+	-	+	+	-	+	+
HB11	+	-	+	+	-	+	+
MDP3	+	-	+	+	-	+	+
AK1	+	-	+	+	-	-	+
HB15	+	+	-	-	+	-	-
HP4	+	-	-	-	-	+	+
HB16	+	-	-	-	+/-	+	+
DP6	+	-	-	-	-	+	+
DP5	+	-	-	+	-	+	+

Çizelge 4.4. devamı

HB6	+	-	-	-	-	+	+
HP4	+	-	-	+	-	+	+
MDP1	+	-	-	+	-	+	+
HP4	+	-	-	-	-	+	+
HP4	+	-	-	+	-	+	+
HB1	+	-	-	-	-	+	+
DSP2	+	-	-	+	-	+	+
HB12	+	-	-	+	+	-	+
DP5	+	+	-	-	+	-	+
HB4	+	-	-	-	-	+	+
HP4	+	-	-	-	-	+	+
HB16	+	-	-	-	-	+	+
DP6	+	-	-	-	-	+	+
HB12	+	-	+	+	-	+	+

Koloni morfolojisine göre şüpheli *Bacillus cereus* olarak değerlendirilen DSP1, MDP3, HP4, DP6, HB6, HP4, HB1,HP4, HB16, DP6 kodlu gıda örneklerinden elde edilen 10 izolatın gram (+) oldukları görülmüştür. Biyokimyasal test sonuçları Çizelge.4.3.'te verilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.4. ile karşılaştırıldığında bu izolatların *Bacillus cereus* olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5. *Bacillus cereus* 'un hücre morfolojisi ve biyokimyasal özellikleri (Mac Faddin 1999)

Pigment	Gram Reaksiyonu	Katalaz	İndol	Oksidaz	Jelatin Hidrolize	Metil Red	Voges Proskouer	Sitrat	Hareket
Pembe	+	+	-	-	-	-	+	+	+

Koloni morfolojisine göre *Bacillus cereus* olarak değerlendirilemeyen HB4, DP5 kodlu gıda örneklerinden elde edilen izolatlar ile HB15, HB16 örneklerinden elde edilen izolatlar gram reaksiyonu biyokimyasal test sonuçları yönünden incelenmiştir. Hücre morfolojisi gram (-) ve basil olan bu izolatların, indol pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, jelatin hidrolize negatif, metil red pozitif, Voges Proskouer negatif, sitrat negatif oldukları görülmüştür. Yapılan literatür çalışması sonucu (Çizelge 4.5.) bu izolatların MYPA'da gelişebilen refakatçı floraya ait *Escherichia coli* olduğu görülmüştür (Anonymous, 2019-a).

Koloni morfolojisinde *Bacillus cereus* olarak tanımlanamayan pembe çökeltisiz kolonilerin gram reaksiyonları ve biyokimyasal test sonuçları incelenmiştir. Hücre morfolojisi gram (-) ve çubuk görünümlü olan AK1 kodlu bebek maması örneklerine ait izolatların, katalaz pozitif, indol ve oksidaz negatif, jelatin hidrolize, metil red, sitrat pozitif, voges proskouer negatif oldukları görülmüştür. Yapılan literatür çalışması sonucu (Çizelge 4.5.) bu izolatlar MYPA'da gelişebilen refakatçı floraya ait *Pseudomonas aeruginosa* olduğu görülmüştür (Anonymous, 2019-a).

Koloni morfolojisinde *Bacillus cereus* olarak tanımlanamayan pembe çökeltsiz kolonilerden HB2, HB12 kodlu bebek maması örneklerine ait izolatların hücre morfolojisinin gram (-) ve kısa çubuk şeklinde olduğu görülmüştür. Bşyokimyasal tanımlama testlerinde ise katalaz pozitif, indol ve oksidaz negatif, jelatin hidrolize, metil red, sitrat pozitif, voges prouskouer negatif oldukları görülmüştür. Yapılan literatür çalışması sonucu (Çizelge 4.5.) bu izolatların

MYPA'da gelişebilen refakatçı floraya ait *Proteus mirabilis* olduğu görülmüştür (Anonymous, 2019-a).

Son olarak şüpheli kolonilerden *Bacillus cereus* olarak tanımlanamayan MDP1,DP6,K2,DSP1,KP4,HB6,HB11,MDP3,DP5,HP4,MDP1,DSP2,HB12,HP4 örneklerine ait pembe çökeltisiz koloniden elde edilen hücre morfolojisi gram (+) ve zincir şeklinde çubuk görünümlü izolatların katalaz pozitif, indol negatif, oksidaz değişken, jelatin hidrolize pozitif, metil red negatif, voges proskouer ve sitrat pozitif oldukları görülmüştür. Yapılan literatür çalışması sonucu (Çizelge 4.5.) bu izolatların MYPA'da gelişebilen *Bacillus subtilis* olduğu görülmüştür (Anonymous, 2019-a)

Çizelge 4.6. MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Agar'da gelişebilen refakatçi floranın koloni morfolojileri (Anonymous, 2019-a) ve biyokimyasal özellikleri (Anonymous, 2019-b)

	Koloni	Gram	Katalaz	İndol	Oksidaz	Jelatin Hidrolize	MR	VP	Sitrat
Bacillus cereus	Pembe çökeltili	+ Basil	+	-	-	-	-	+	+
E. coli	Renksiz çökeltisiz	-Basil	+	+	-	-	+	-	-
Pseudomonos aeruginosa	Renksiz çökeltisiz	- Basil	+	-	+	+	-	-	+
Proteus mirabilis	Pembe çökeltisiz	- Basil	+	-	-	+	+	-	+
Bacillus subtilis	Pembe/Sarı çökeltisiz	+Basil	+	-	Değişken	+	-	+	+
Staphylococcus aureus	Sarı çökeltili	+ kok	+	-	-	+	+	+	+

Çalışmamızda; klasik kültürel yöntemler ile izole edilen 32 izolata uygulanan ileri tanımlama testleri sonucunda bunların 10 'u *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır ve *Bacillus cereus* izole edilen kaynakların 4'ünün DSP1,MDP3,DP6 kodlu pirinç unu örneklerinden 6'sının HP4,HB6, HB1, HB16, DP6 kodlu bebek maması örneklerinden olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* olarak

tanımlanan 4 izolatın 3'ünün HB4, HB15, HB16 koldlu bebek maması örneklerinden 1'inin DP5 kodlu pirinç unu örneğinden olduğu tespit edilmiştir. *Proteus mirabilis* olarak tanımlanan 2 izolatın HB2 ve HB12 kodlu bebek maması örneklerinden, *Pseudomonos aeruginosa* olarak tanımlanan 2 izolatın AK1 kodlu bebek maması örneğinden olduğu tespit edilmiştir. *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan 14 izolattan 4'ü DP6,HB6, HB11, HP4, HB12 kodlu bebek maması örneklerinden 10'u DP6, K2, DSP1, KP4, MDP3, DP5, MDP1, DSP2 kodlu pirinç unu örneklerinden izole edilmiştir. Çalışmamızda aranan mikroorganizmalardan olan *Staphylococcus aureus* örneklerimizin hiçbirinden izole edilememiştir.

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğine göre bebek maması formülleri (özel diyet amaçlı tıbbi gıdalar dahil), tahıl unları ve pişirildikten sonra tüketime sunulan çözünen toz karışımlar için *Bacillus cereus* üzerinde durulan önemli bir mikroorganizmadır. Çalışmamızda yer alan bebek maması ve pirinç unu örneklerini Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğine göre *Bacillus cereus* varlığı açısından değerlendirildiğinde 74 bebek maması örneğinin 6' sının, 50 ambalajlı pirinç unu örneğinin 3'ünün, 10 dökme olarak satışa sunulan pirinç unu örneğinin 1'inin kodekse uygun olmadığı tespit edilmiştir.

Tuncer ve arkadaşları (1987), yerli ve ithal bebek mamalarından oluşan toplam 200 adet mama örneğini (172 yerli üretim mama, 28 Avrupa'dan ithal mama)analize almışlardır ve 200 adet gıda numunesinin 36'sında *Bacillus cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Giffel ve ark. (1996), *Bacillus cereus* ve *B.subtilis* varlığı tespitine yönelik analizlerinde pasta, süt, un, maya, kakao, çin yemekleri, çikolata, unlu mamuller, et ürünleri, baharat, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri olan bitkilerden oluşan toplam 229 gıda örneğini kullanmışlardır. Örneklerin 18'inde *B.subtilis* izole ederken 109'unda *B.cereus* 12'sinde ise hem *B.cereus* hem *B.subtilis* izole etmişlerdir.

Seyrekbasan Kaan, 2000 yılında 40 ithal bebek maması numunesini patojen bakteriler yönünden incelemiştir. *Salmonella* spp, *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa ve C.perfringens*'e rastlamazken 1 numunede (%2,5) *Bacillus cereus* saptamıştır.

Ergün ve ark. (2002) çalışmalarında Türkiye'de satışa sunulan toplam 60 adet bebek ve çocuk maması örneğini analize almışlardır ve örneklerden 2 tanesinden *Bacillus cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Göl (2014)'de bebek mamalarında *Bacillus cereus* toksinlerinin varlığına yönelik yaptığı çalışmasında 160 adet gıda örneği kullanmıştır ve örneklerin 2'sinden (%1,25) *Bacillus cereus* izole edebildiğini ve örneklerdeki *Bacillus cereus* miktarının ise $2x10^1$ kob/g ile $4x10^1$ kob/g olduğunu bildirmiştir.

Çalışma sonuçlarımızın firma bazında değerlendirmesi Çizelge.4.6. 'da verilmiştir.

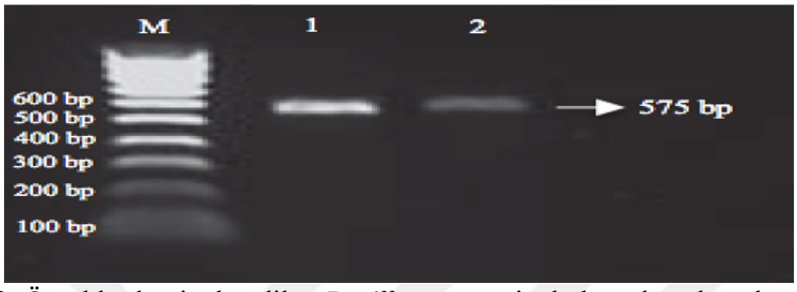
Çalışmamızda bebek maması ve pirinç unu örneklerinden *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis, E.coli, Pseudomonos aeruginosa* izole edilmiş olması bu gıdaların tüketilmesinin tehlike arz ettiğini göstermektedir. Ayrıca gıda örneklerinin çoğunun ambalajlı şekilde satışa sunulanlardan olması üretim ortamlarının ve paketleme koşullarının hijyen açısından yeterli olmadığını düşündürmektedir.

4.3. Klasik Kültürel Yöntemle İzole Edilen Şüpheli *Bacillus cereus*'ların Moleküler Yöntemle Doğrulanması

Bebek maması ve pirinç unu örneklerinden izole edilen şüpheli *Bacillus cereus* izolatlarının biyokimyasal tanımlamasını doğrulamak amacıyla moleküler tanımlama yapılmıştır. Biyokimyasal testler sonucu *Bacillus cereus* şüpheli olarak tanımlanan 10 izolat moleküler olarak da doğrulanmıştır.

Şekil 4.3.'de şüpheli kolonilerden ekstrakte edilen DNA örneklerine uygulanan PCR amplifikasyonu sonucu dış zar proteini (OmpA) olarak sınıflandırılan flageller motor protein MotB' yi kodlayan *motB* gen bölgesi spesifik

bölgelerin bant görüntüleri ve elektroforez tankında jel görüntüsü verilmiştir. Şekil 4.3'de markerın 575bp'de oluşturduğu banta yakın yerde bant oluşturmuş olan 10 örneğin *Bacillus cereus* olduğu görülmüştür.



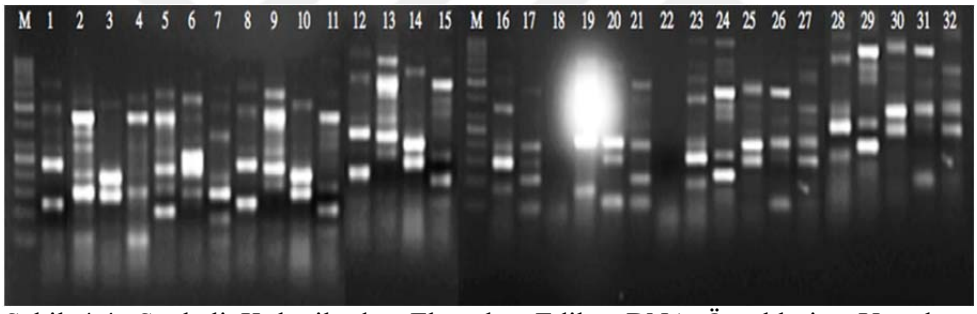
Şekil 4.3. Örneklerden izole edilen *Bacillus cereus* izolatlarından ekstrakte edilmiş DNA örneklerine uygulanan PCR sonucu elektorforezdeki DNA bant görüntüleri

Moravek ve ark. (2004), bebek maması örneklerinden klasik yöntemle izole ettikleri *Bacillus cereus* izolatlarının moleküler yöntemle tanımlanmaları için hb1D gen bölgesine ait kendi tanımladıkları spesifik L1a-F L1a-R primerleri**ni** kullanmışlar ve *Bacillus cereus*'u moleküler olarak tür bazında tanımlamışlardır ve bu primerlerin *B. cereus*'un moleküler tespitinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

4.4. Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların RAPD -PCR İle genetik yakınlıklarının tespiti

RAPD-PCR metodu, DNA yapısındaki polimorfizmi saptamak amacıyla düşük bağlanma sıcaklığında 9 veya 10 baz uzunluğunda bir veya daha fazla kısa primer kullanarak DNA'daki birden fazla bölgeyi amplifiye etmeye yönelik bir tekniktir (Williams ve ark., 1990). PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanır. Karşılaştırılan örnekler arasında görünen farklı (polimorfik) ve aynı (monomorfik) DNA bantları sayıldıktan sonra sonuçlar değerlendirilmektedir. Genetik çeşitliliğin araştırılmasında ve genom haritalamalarında RAPD-PCR tekniği sıklıkla kullanılmaktadır (Cenis, 1993).

Denatüre ve tek iplikçikli DNA'ya rastgele ve düşük duyarlılıkta aynı zamanda yüksek tuz yoğunluğu ve düşük bağlanma sıcaklıklarında bağlanan kısa rastgele primerler ile DNA fragmentlerinin çoğaltılması mantığına dayanan RAPD-PCR tekniği identifikasyon için bir alternatif olmamakta genellikle izlem yöntemi olarak bilinen sürveyans yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Tekniğin ayırım gücü eşit reaksiyon şartlarında primerlerin düşük duyarlılıkda da olsa tek sarmallı DNA üzerinde aynı hedef dizilere bağlanmalarıdır. Çoğaltılmış band fragmentlerinin polimorfizmine dayanarak suşlar arasındaki genetik ilişki gösterilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız random kısa primerler; F-5`CCGAGTCCA3` ve R-5'CCGGCGGCG3' olup 30 siklus sonunda çoğalttıkları DNA bant profilleri karşılaştırılmış ve birbirleri ile olan ilişkileri incelenmiştir (Şekil 4.2)

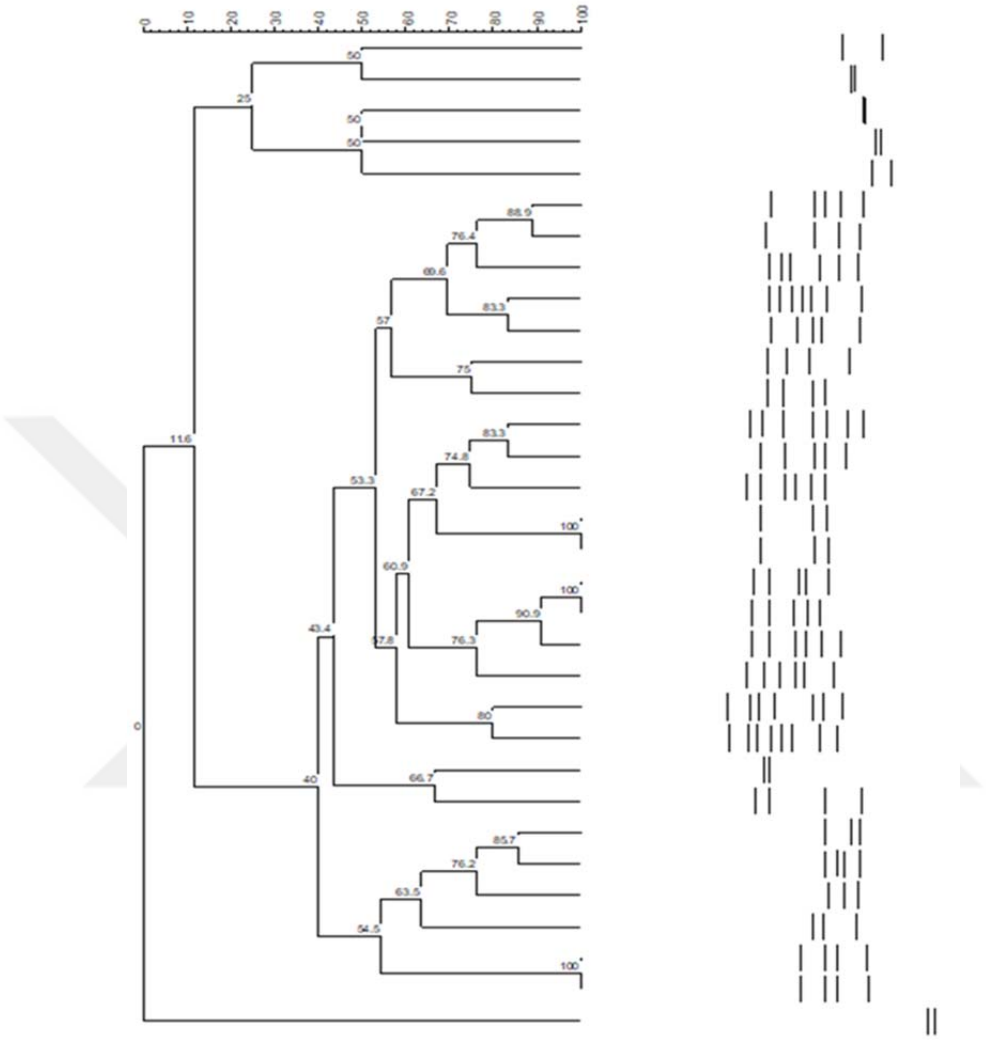


Şekil 4.4. Şüpheli Kolonilerden Ekstrakte Edilen DNA Örneklerine Uygulanan RAPD-PCR elektroforez Jel Görüntüsü

Çalışmamızda 32 adet suş içerisinde *Bacillus cereus* olarak tanımlanan 10 suşun tür/tür içi ayrımında RAPD tekniğinin taksonomik sınıflandırma özelliğinden yararlanılmıştır. Bu amaçla mikroorganizmalardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Genomik DNA üzerinde farklı bölgelere bağlanabilen 9 nükleotit uzunluğunda kısa oligonükleotit primerler kullanılarak RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak farklı uzunluklara sahip PCR ürünlerinin oluşturduğu bant modelleri % 2' lık agaroz jel üzerinde gözlemlenmiştir. Bu bant görüntüleri GelCompar II, Version 4.1 (AppliedMath) yazılım programına aktarılmıştır. RAPD bantları arasındaki benzerlik "Pearson

product moment correlation coefficient" değeri (r) ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme işlemi yapılmış ve sonuçta türler/suşlar arasındaki genetik ilişki dendogram olarak gösterilmiştir. Kümeleri birbirinden ayırt etmek için korelasyon katsayısı tarafımızdan % 95 olarak belirlenmiştir. Elde edilen dendogram incelendiğinde *B. cereus* izolatlarımızın kendi aralarındaki ilişki oranının %70 lerde olduğu yani genetik yakınlıklarının düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3)

Choo ve ark. (2007) çalışmalarında, Kore'den satın alınan 140 kurutulmuş kırmızıbiber numunesini, standart kültür yöntemine göre *B. cereus* varlığı açısından test etmişlerdir. Biyokimyasal doğrulama testlerine *B. cereus* izolatlarının genetik çeşitliliği DNA RAPD tayini kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan PCR taramaları sonucunda kurutulmuş kırmızıbiber numunelerinin % 84.3' ünde *B. cereus'* u tespit etmişlerdir ve 1.9 x 10 ^{4}kob/g miktarında olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.5. İzole edilen suşların dendogram ile ilişkilerinin gösterilmesi

Sonuç olarak bu çalışmada moleküler yöntem ile klasik kültürel yöntem birlikte çalışılmıştır. Biyokimyasal tanımlaması yapılan DSP1,DP6 kodlu pirinç unu örnekleri ve HP4, HB6, HB1, HB16 kodlu bebek maması örneklerinden izole edilen 10 *Bacillus cereus* suşu klasik PCR yöntemi ile de tanımlanmıştır. Bu da iki yöntemin birbirini desteklediğini göstermiştir. Aynı zamanda tüm *Bacillus cereus* suşlarının RAPD-PCR tekniği ile aralarındaki genetik yakınlık incelenmiştir.

Sonuç olarak ilişkinin %70 olduğu görülmüştür ve çalışmaya kontrol amaçlı dahil ettiğimiz diğer izolatlar ile de ilişkilerinin düşük olduğu dolayısıyla ilişkisiz oldukları görülmüştür. Bu veriler doğrultusunda izole ettiğimiz *B. cereus* suşlarının tek kaynaktan köken almadığını gıdanın saklanması veya üretimi sırasında saklama aşamasında fakat kontamine kaynaklarının farklı olduğunu göstermiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bacillus cereus doğada yaygın olarak bulunan ve gıda zehirlenmesine neden olan patojen bir bakteridir. Lipolitik, proteolitik ve spor oluşturma özelliğinden dolayı gıda hijyeni açısından da oldukça önemli bir etkendir. Sporlarının farklı çevre koşullarına (nem, pH, sıcaklık vb.), kurutma, ısıtma ve vakumlama işlemlerine karşı yüksek direnç göstermesi bu önemi daha da arttırmaktadır. *B. cereus* ile meydana gelen gıda zehirlenmelerinde pirinç başta olmak üzere bakliyatların önemi büyüktür.

Çalışmamızda, bebek beslenmesinde da kullanılan pirinç unu ve bebek maması örneklerinde tespit ettiğimiz *Bacillus cereus*'un yanında enfeksiyon yapabilecek fırsatçı patojenlerden *Bacillus subtilis*, *Proteus miribalis, Pseudomonos aeruginosa*, ve fekal bulaşma indikatörü *E.coli* de izole edilmiştir. Bu durum bu gıdalar ile beslenen bebek, çocuk, yetişkin her insan için risk oluşturmaktadır. Bu sebeple bu gıdaların rutin kontrollerinin sürdürülmesi, üretici ve ithalatçı firmaların bilgilendirilmesi önem taşımaktadır.

Çalışmamızda *Bacillus cereus*'a dökme olarak satışa sunulan pirinç unu örneklerinin yanı sıra ambalajlı pirinç unu ve ambalajlı bebek maması örneklerinde de rastlanmıştır. Aeorob bir bakteri olan *Bacillus cereus*'un ambalajlı gıdada bulunabilmesi pirinç unu ve bebek mamalarının ham maddelerinden gelen *Bacillus cereus*'un sporlarının ısıtma, vakumlama ve kurutma gibi gıda işleme proseslerine direnç göstermelerindendir. Bu sporlar daha sonra uygun koşullar oluştuğunda çimlenerek patojen etkilerini gösterecek düzeye gelebileceklerdir.

Bacillus cereus, sadece ham maddeden değil aynı zamanda işletmede ürünün hazırlanması sırasında kullanılan girdilerden, imalat sırasındaki işlemlerden, paketlemede kullanılan ambalajdan, üretimde çalışan personelden, depo koşullarından veya çevre şartlarından da bulaşabilmektedir. Bu sebeple yüksek mikrobiyolojik kalite sağlamak için özellikle bağışıklık sistemi gelişmemiş bebeklerin beslenmesinde kullanılan bebek maması üretiminde geçerli olan iyi

üretim uygulamaları (Good Manufacturing Practice;GMP) kurallarına uyulmalıdır. Üretimde kullanılan ham maddenin mikrobiyolojik kontrolleri titizlikle yapılmalı, üretimde çevresel faktörlere ve GMP kurallarına dikkat edilmelidir. Yüksek otokontrol sisteminin olması, resmi denetimlerin sayısının artırılması da sağlığa uygun üretimlerin yapılmasında önem arz etmektedir.

FAO tarafından 2004 yılında toz bebek mamaları ile ilgili yapılan toplantıda, bebek mamalarında bulunabilecek ve enfeksiyona neden olabilecek mikroorganizmalar A, B, C olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Buna göre, *Cronobacter* spp. ve *Salmonella* enterica A grubu; *Enterobacteriaceae* üyeleri B grubu; *B. cereus*, *L. monocytogenes* gibi bakterilerin yer aldığı diğer mikroorganizmalar ise C grubu risk oluşturan tehlike olarak tanımlanmışlardır (FAO, 2004).

Pirinç unu, bebek maması ve pirinç unu bazlı gıdaların *Bacillus cereus* ile kontaminasyonunu önlemek ve azaltmak için alınacak tedbirler arasında öncelikli olarak kullanılacak ham maddeler üretime girmeden önce kontrol edilmelidir ve sonrasında sporların germinasyonu ve vejatatif hale geçmelerini önleyecek tedbirler alınması önemlidir. Bu amaçla, pişirme işlemlerin ardından ürünlerin hızlı soğutulması ve sonrasında buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmesi ve böylelikle vejetatif hücrelerin çoğalarak risk oluşturacak sayıya ulaşması engellenebilir. İşletmelerde kontaminasyonların engellenebilmesi için ortam havası başta olmak üzere depolama, paketleme ve taşıma süreçlerinde gerekli hijyen tedbirlerinin alınması riskleri en aza indirebilecektir. Üretimde çalışan personel hijyen konusunda belirli periyodlarda bilgilendirilmelidir. Ve rutin olarak ürünlerin kalite kontrolleri yapılmalıdır.

Sonuç olarak; bebek beslenmesinde kullanılmakta olan mamaları ve bunun yanı sıra her kesimden insanın beslenmesinde kullanılmakta olan pirinç unları gıda bozulmalarına ve zehirlenmelere sebep olan *Bacillus cereus* açısından kirli bulunmuştur. unların yanı sıra fırsatçı floraya ait *Bacillus subtilis, Proteus mirabilis, Pseudomonos aeruginosa,*ve fekal bulaşma indikatörü *E.coli* açısından

kirli olduğu görülmüştür. Bu ürünleri üreten işletmelerin oto kontroleriyle dış denetimlerinin daha sıklıkla yapılması olası zehirlenme ve bebek ölümlerini engelleyebilecektir. Bu durum gıda güvenilirliği ve halk sağlığı açısından da önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

Akbulut, Onur. (2010). İstanbul İlinde Hazır Yemek Üreten Firmaların Ürettikleri Yemeklerin Bazı Patojen Bakteriler Bakımından İncelenmesi''. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi,.70-75

Aksu, H., Ergün, Ö. (1994). Hazır Çorbalarda *Bacillus cereus* 'un Varlığı. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi,25(1-2),77-82.

Ankolekar, C., Rahmati, T., Labbé, R.G., (2009). Detection of Toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Spores in U.S. Rice. International Journal of Food Microbiology, 128(3), 460-466.

Anonymous,1977, TS 2639 Pirinç Unu Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara

Anonymous, 2008, ISO 22000 Dokümanları. Söz Konusu Gıda İşletmesi. İç Anadolu Bölgesi.

Anonymous, 2019-a. http://www.mikrobiyoloji.org/

Anonymous, 2019-b. https://microbiologyinfo.com

Ash, C., Farrow, JA., Dorsch, M., Stackbrandt, E., Collins, M.D. (1991) Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 343–346

Ayhan, K. (2000). Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, Sim Matbaacılık Ltd. Ankara. 43-44.

Batchoun, R., Al-Sha'er, A.I. Khabour, O.F., 2011. Molecular Characterization of *Bacillus cereus* Toxigenic Strains Isolated From Different Food Matrices in Jordan. Foodborne Pathogens Diseases, 8(11), 1153-1158.

Becker, H., Schaller, G., von-Wiese, W. ve Terplan, G. (1994) *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. International Journal of Food Microbiology, 23(1), 1-15.

Beecher, D.J. ve Wong, A.C. (2000). Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. Microbiology, 146(6), 1371-80. Erişim 20.06.2013, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846215

Carlin, F., Fricker M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., SalkinojaSalonen, M., (2006), Emetic toxin- producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. International Journal of Food Microbiology, 109, 132-138.

Choma, C., Granum, P.E. (2002) The enterotoxin T (*Bacillus cereus* ET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. FEMS Microbiology Letter, 217, 115-119.

Choo, E., Jang, S.S., Kim, K., Lee, K.G., Heu, S., Ryu, S., 2007. Prevalence and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* in Dried Red Pepper in Korea. Journal

Chung,K-T., Sun H-L.(1986) Distribution and characteristics of *Bacillus cereus* isolated from rice in Taiwan .J.Food Sci.,51(5): 1208-1212,

Çoksaygılı, N., Başoğlu, F., Bursa Piyasasında Satılan Hazır Toz Çorbaların Mikrobiyolojik ve Bazı Kimyasal Özellikleri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi (2011) 25(1): 87-95.

Çolak , H., Ulusoy, B., Bingöl, B., Hampikyan, H., Muratoğlu, K. (2007) Tüketime Sunulan Hazır Yemeklerin Mikrobiyolojk Kalitesinin İncelenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Dergisi (2007) 37 (4) : 225-233.

Çöl, B. G. 2014. Çeşitli Gıdalarda *Bacillus cereus* Toksinlerinin Varlığı ve Tiplendirilmesi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 147, İstanbul.

EFSA (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2010. EFSA Journal, 10(3), 2597. Erişim 14.05.2019, http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf

EFSA (2013) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2011. EFSA Journal, 11(4),3129,Erişim,16.12.2019,http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V18N15/art20449.pdf

Ergün, Ö., Aksu, H., Arun, Ö.Ö., ve Çolak H. (2002). Ülkemizde satılan bebek ve çocuk mamalarında gıda zehirlenmesine neden olan önemli bazı mikroorganizmaların varlığı üzerine araştırmalar. Gıda, 27, 253-257.

Fagerlund, A.,Ween, O., Lund, T., Hardy, S.P. ve Granum, P.E. (2004). Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. Microbiology, 150, 2689–2697.

Faille, C., Membre, J.M., Kubaczka, M. ve Gavini, F. (2002).Altered ability of *Bacillus cereus* spores to grow under unfavorable conditions (presence of nisin, low temperature, acidic pH, presence of NaCl) following heat treatment during sporulation. Journal of Food Protection, 65(12), 1930–1936.

Fangio, M. F., Roura, S. I., Fritz, R. (2010) Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy foods. Journal of food science, 75(4): 218-221.

Filiz, K. A.,(2001) Çeşitli kuru gıdalarda *bacillus cereus* aranması, sayımı ve identifikasyonu. Ege Üniversitesi, İzmir

Finlay, W.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D. (2000) *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. Letters Applied Microbiology, 31, 385–389

Forsythe, S.J. (2000) Basic aspects İçinde Forsythe, S (ed.). The microbiology of safe food. MA: USA; Blackwell Science. 10-52.

Gül, U., 2003, Çeltik, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, Bakış Dergisi, 3(15), 4s.

Güler, S. (2006) Tarçının Sütteki *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* Bakterisine Etkisi. Gebze yüksek teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 46, Gebze.

Granum P.E., Lindbäck, T. (2013) *Bacillus cereus* Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (Eds.). Food Microbiology Fundamentals and Frontiers (4rd ed.), Washington: DC, ASM Press, 491–499.

Granum, P.E. (2007) *Bacillus cereus* Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (Eds.) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, (3rd Ed.). Washington, D.C., ASM Press, 445–455.

Haggblom, M.M., Apetroaie, C., Andersson, M. (2002) Quantitative analysis of Cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. Applied and Environmental Microbiology, 68, 2479-83.

Henriques, A.O., Moran, C.P. (2007) Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annual Reviews of Microbiology, 61, 555-588.

Hossain, M., Fischer, K.S. (1995) Rice research for food security and sustainable development in Asia: Achievements and future challenges. Geojournal, 35(3), 286-298.

Jang, J.H., Lee, N.A., Woo, G.J., Park, J.H. (2006) Prevalence of *Bacillus cereus* group in rice and distribution of enterotoxin genes. Food Science and Biotechnology, 15, 232-237.

Jay, J.M. (1970). Food Poisoning Caused by Gram Positive Spore-Forming Bacteria. Modern Food Microbiology. Reinhold Book Corp, London, 328p.

Kalaylı, E., Beyatlı, Y. (2003) *Bacillus* cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB üretimleri ve Plazmid DNA'ları. Orlab On-line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(11), 24. Erişim 18.04.2019, http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702031104.pdf

Kalkan, S., Halkman, K. (2006) *Bacillus cereus* ve içme sütünde oluşturduğu sorunlar, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 4(1), 1-11. Erişim 20.03.2020, www.mikrobiyoloji.org/pdf/7020601101.pdf

Kalkan, S., Halkman, K. (2006) *Bacillus cereus* 'un Standart Analiz Yöntemi, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 4(3), 31-36. Erişim 10.04.2020 http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702060302.pdf

Kaleli, D., Özkaya, F. (2000) *Bacillus cereus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, 395-401. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.

Kaynar, P., Beyatlı, Y., (2006) Balıklardan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 4(3):1-30.

Karapınar, M., Gönül, Ş. A., 2003 Hububat ve Hububat Ürünlerinde Mikrobiyolojik Bozulmalar, Patojen Mikroorganizmalar ve Muhafaza Yöntemleri. Gıda Mikrobiyolojisi. Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (Edt.), Baskı, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, s. 369-384.

Le Lay, J., Bahloul, H., Sérino, S., Jobin, M., Schmitt, P. (2015) Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydoreduction potential levels, Food Microbiology. Vol:46 s: 314-321

May FJ, Polkinghorne BG, Fearnley EJ. Epidemiology of bacterial toxin-mediated foodborne gastroenteritis outbreaks in Australia, 2001 to 2013. Commun Dis Intell Q Rep. 2016 Dec 24;40(4):E460-E469.

MacFaddin, J. F. (1999) Biochemical Test for Identification of Medical BacteriaThird Edition. 589 s.

Meldrum, R.J., Ribeiro, C.D.R., Smith, M.M., Walker, A.M., Simmons, M.,Worthington, D. ve Edwards, C. (2005) Microbiological quality of ready-toeat foods: Results from a long term surveillance program (1995 through 2003). Journal of Food Protection, 68, 1654-1658.

Moravek, M., Dietrich, R., Buerk, C., Broussolle, V., Guinebretiere, MH., Granum P E, ve ark.(2006) Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* izolates by quantitative enterotoxin analyses. FEMS Microbiology Letters, 257, 293-298.

Mosso, M. A., Arrıbas, M. L. G., Cuena, J. A., De La Rosa, M. C. (1989) Enumeration Of *Bacillus* And *Bacillus cereus* Spores İn Food From Spain. *Journal Of Food Protection*, *52*(3), 184-188.

Murindamombe, G.Y., Collison, E.K., Mpuchane, S.F. ve Gashe, B.A. (2005) Presence of *Bacillus cereus* in street foods in Gaborone, Botswana. Journal of Food Protection, 68, 342-346.

Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenaere, J., ... & Dierick, K. (2011)Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *Journal of clinical microbiology*, *49*(12), 4379-4381.

Nilsson, J., Svensson, B., Ekelund, K. ve Christiansson, A., 1998. A RAPD-PCR Method for Large-Scale Typing of *Bacillus cereus*. Letteres in Applied Microbiology. 27, 168-172.

Nduhiu, J., Jackson, N.O., Dorcas, W.N. ve Michael, M.G. (2009). Genetic characterization of food borne *Bacillus cereus* strains from milk, cheese and rice by multiplex PCR assay. International Journal of Integrative Biology, 5(2), 82-86.

Özdemir, H. (2003). Pastörize Sütlerde *Bacillus cereus* 'un Varlığı Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları: 611-615. Erişim 08.04.2013, http://library.cu.edu.tr/tezler/8229.pdf

Park, Y.B., Guo, J.Y., Rahman, S.M., Ahn, J. ve Oh, D.H. (2009). Synergistic effect of electrolyzed water and citric acid against *Bacillus cereus* cells and spores on cereal grains. Journal of Food Science, 74(4), 185-189

Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S.R., Jensen, G.B. ve Wilcks, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. FEMS Microbiology Letters, 250, 129-136.

Sağlık Bakanlığı. 'Gıda Kökenli *Bacillus cereus* Zehirlenmesi'. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi,

Sekin, Y. ve Karagözlü, N. 1997. Gıda Mikrobiyolojisi Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. 4. Basımdan Çeviri. Literatür Yayıncılık. Dağıtım No: 115

Pehlivanlar, S. ve Şireli, U.T. (2004). Enteroroksijenik *Bacillus cereus*'un çiğ köftede enterotoksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 18(1), 45-50.

Shaheen, R., Andersson, M.A., Apetroaie, C., Schulz, A., Ehling-Schulz, M., Ollilainen, V.M. ve Salkinoja-Salonen M.S. (2006). Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, Cereulide. International Journal of Food Microbiology, 107(3), 287-94.

Serdaroğlu, M., Tömek, S. Fermente Et Ürünlerinde Proteolitik Enzimlerin Önemi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 1995; 3(1), 89-94.

Soltan Dallal, M. M., Heydari, M. R., Sharifi Yazdi, M. K., & Mossadegh, M. H. (2016). The prevalence of Salmonella and *Bacillus cereus* contamination from pudding and sesame pudding produced by traditional methods in Yazd province of Iran. Pajoohandeh Journal, 21(2), 80-86.

Şahin, D. 2010, ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemleri Uygulanan Bir Gıda İşletmesinde Pirinç Unu Üretim Prosesindeki Mikrobiyolojik Risklerin İzlenmesi ve Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Şenses-Ergül Ş, Sarı H, Ertaş S, Berberoğlu U, Cesaretli Y, Irmak H. Tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Türk Hijyen Den Biyoloji Dergisi, 2015; 72 (3): 199-2

Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Leijendekkers, S., Rombouts, F. M. (1996). Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilisin* foods in the Netherlands. Food Microbiology, 13(1), 53-58.

VAR, I., ERGİNKAYA, Z., KABAK, B., 2003. Adana piyasasında satılan çeşitli pastalarda bazı patojen mikroorganizma ve rop sporu varlığının araştırılması Unlu Mamuller Teknolojisi,59,34-45.

Wijnands, L.M., Dufrenne, J.B., Rombouts, F.M., in't Veld, P.H. ve Van, F.M. (2006). Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands. Journal of Food Protection, 69, 2587-2594.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Ankara'nın Polatlı ilçesinde doğdu. İlköğretimi Beypazarı'nda tamamladı. Ortaöğretim Adana Recep Birsen Özen Ortaokulu, Lise öğrenimini Adana Yüreğir Halıcılar Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2014 yılında aynı bölümden Fen Bilgisi Öğretmeni ünvanı ile mezun oldu. 2015 yılında Yüreğir Yunusoğlu Ortaokulu'na Fen Bilgisi Öğretmeni olarak atandı. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim dalında yüksek lisans programına başladı şu anda Seyhan Nuri ve Zekiye Has Ortaokulu'nda görev yapmakta. Evli ve bir çocuk annesi.