



**PASTÖRİZE VE ÇİĞ SÜTLERDE *Bacillus cereus*'un
MOLEKÜLER TESPİTİ**

Elif Bozkurt

Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Ocak - 2020

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PASTÖRİZE VE ÇİĞ SÜTLERDE *Bacillus cereus*'un
MOLEKÜLER TESPİTİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif Bozkurt

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

KARAMAN-2020

TEZ ONAYI

Elif Bozkurt tarafından hazırlanan “Pastörize ve Çiğ Sütlerde *Bacillus cereus*’un Moleküler Tespiti” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS** Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Juri Üyeleri

Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Sabire YERLİKAYA

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KINAY

İmza:




Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

Doç Dr. Sadık Alper YILDIZEL

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



Elif Bozkurt

ÖZET

Yüksek Lisans

PASTÖRİZE VE ÇİĞ SÜTLERDE *Bacillus cereus*'un MOLEKÜLER TESPİTİ

Elif Bozkurt

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Şubat, 2020, 54 sayfa

Süt insan beslenmesinde en önemli temel gıda kaynaklarından biridir. Ancak hijyenik koşullar sağlanmadan üretilmesi, saklanması, işlenmesi ve gerekli kontrollerin yapılmaması durumunda insan sağlığına zararlı maddeler içermektedir. *Bacillus cereus* doğada yaygın olarak bulunan ve gıda zehirlenmesine neden olan patojen bir bakteridir. Son yıllarda özellikle *B. cereus* ile kontamine olan süt ve süt ürünlerinin insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri olduğu, kontamine süt ve süt ürünlerinin muhafazası sırasında toksin madde oluşturdukları bildirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı; çiğ süt ile pastörize süt örneklerinde gıda zehirlenmesi ve kalite kaybı gibi olumsuz etkilere neden olan *B. cereus* bakterisinin moleküler düzeyde tür tespitinin yapılmasıdır. Süt örneklerinde *B. cereus*' un moleküler tespiti 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. Bu çalışmada spesifik primerler kullanılarak yapılan moleküler tür tespiti ile süt ve süt ürünlerinde *B. cereus*'un hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus cereus*, Moleküler Tür Tespiti, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Süt.

ABSTRACT

Ms Thesis

MOLECULAR DETECTION of *Bacillus cereus* in

PASTEURIZED and RAW MILK

Elif Bozkurt

Karamanoğlu Mehmetbey University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOğLU

Feb, 2020, 54 pages

Milk is one of the most important basic food sources in human nutrition. However, it contains substances harmful to human health if it is produced, stored, handled without the hygienic conditions and the necessary controls are not performed. *Bacillus cereus* is a pathogenic bacterium that is common in nature and causes food poisoning. In recent years, it has been reported that especially milk and milk products contaminated with *B. cereus* have negative effects on human health and toxin substances are formed during the storage of contaminated milk and milk products.

The aim of this study is to molecularly determine the species of *B. cereus* bacterium which causes negative effects such as food poisoning and quality loss in raw milk and pasteurized milk samples. Seven primers specific to *IAC*, *16S rRNA*, *nheA*, *nheB/nheC*, *hblC* and *hblD* gene regions were used for the molecular determination of *B. cereus* in milk samples. At the end of the study, *Bacillus cereus* bacteria were detected as molecular in eight of the 13 milk samples. In this study, it has been revealed that *B. cereus* can be detected quickly and reliably in milk and dairy products by molecular species identification using specific primers.

Keywords: *Bacillus cereus*, Molecular Species Detection, Polymerase Chain Reaction, Milk.

ÖN SÖZ

Bu tez çalışmamda bana her zaman tüm samimiyetiyle ve sabırla destek olan bilgileri ve dolu dolu akademik hayatıyla öğrencilerini de her zaman dolu dolu yetiştirmeye çalışan kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU'na teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Begüm TERZİ'ye de teşekkür ederim. Ayrıca çalışmama verdikleri deneysel katkılardan ötürü Dr. Öğretim Üyesi Sabire YERLİKAYA'ya da teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca bütün stres ve sıkıntılarımın maddi manevi desteklerini esirgemeyen canım ailemin üyeleri babam İlyas GÜNVAR, annem Hacer GÜNVAR ve kardeşim İrfan GÜNVAR'a teşekkürlerimi sunarım. Ve her zaman desteğini hep yanımda hissettiğim “sen halledersin” sözüyle her zaman beni başarıya bir adım daha atmamda desteği olan kıymetli eşim Furkan BOZKURT'a sonsuz teşekkür ederim

“Bu Yüksek Lisans Tezi Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğünün 16-YL-18 No'lu Projesi ile desteklenmiştir.”

Elif Bozkurt
Karaman-2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Bakterinin Üretilmesi	18
3.2. Moleküler Tür Tespiti.....	20
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	20
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
5. SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3-1 Çalışmada kullanılan primerlere ait dizi bilgileri.....	23
Çizelge 3-2 Çalışmada kullanılan primerlere ait PCR koşulları	24



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

Şekil 3-1 <i>Bacillus cereus</i> ' un katı besiyerde üreme görüntüsü.....	18
Şekil 3-2 <i>B. cereus</i> ' un katı besiyerden sıvı besiyere aktarımı ve üreme görüntüsü	19
Şekil 3-3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan cihazlar	21
Şekil 3-4 Elektroforez jel görüntüleme cihazı	22
Şekil 3-5 Bant büyüklükleri ve kuyucukları işaretlenmiş jel fotoğrafı.....	25
Şekil 4-1 IAC-F IAC-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon	26
Şekil 4-2 P-F P-R primerleri ile yapılan moleküler karakterizasyonu.....	27
Şekil 4-3 16S-F 16S-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon.....	28
Şekil 4-4 42c1 42c2 nheA-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon.....	29
Şekil 4-5 nheBC1 nheBC12 primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon.....	30
Şekil 4-6 L2a-F L2a-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon.....	31
Şekil 4-7 L1a-F L1a-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon.....	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
bç	Baz çifti
g	Gram
M	Molar
µl	Mikrolitre
V	Volt

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Kob	Koloni oluşturma birimi
Dntp	Deoksi Nükleozin Trifosfat
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EtBr	Ethidium Bromür
NaCl	Sodyum Klorür
MgCl₂	Magnezyum Klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PK	Pozitif Kontrol

1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar hastalıklara ve ölüm gibi ciddi kayıplara neden olmaktadır. Gıda maddelerinin üretiminden tüketimine kadar uygulanan işlemlerin herhangi bir aşamasında gıdaları kontamine etmek suretiyle epidemilere varabilen ciddi halk sağlığı sorunları meydana getirebilmektedir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlar çoğunlukla; hayvansal (et ve süt ürünleri vb.) ve bitkisel kaynaklı gıda kökenli olup, söz konusu hastalıklara bebekler, çocuklar, yaşlılar ve bağışıklık sistemi zayıf kişiler daha yatkın olmaktadır (Tutar ve ark., 2015).

Dünyada hızla artan nüfus ile birlikte besin kaynaklarının sınırlı olması nedeniyle gıdaların verimli kullanılması ön görülmektedir. Aynı zamanda insanların doyması değil, doğru ve dengeli beslenmesi önerilmektedir. Doğru ve dengeli bir beslenmenin proteince zengin hayvansal ürünlerin tüketilmesi ile olacağı ve gıdaların tüketiminin artırılması gerektiği bilinmektedir (Küçüköner ve Tarakçı, 1998).

İnsanlar hayati fonksiyonlarından olan beslenmelerini sürdürmeye devam etmek zorundadırlar. Bu nedenle ihtiyaç duyulan besin kaynakları bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilmektedir. Bunun yanında süt, yumurta ve et gibi hayvansal kökenli gıda maddeleri içerdikleri biyolojik değerler nedeniyle önem arz etmektedir (Coşkun, 1995).

Türk Gıda Kodeksinin yapmış olduğu tanıma göre “süt bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 40 °C’ nin üzerine ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi bir işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır”. Tayar ve Şen (2007) ise sütü, “memeli hayvanlarda doğum sonrasında yavruların gıda gereksinimini karşılamak için meme bezlerinde oluşan besin değerleri açısından zengin olan biyolojik sıvı olarak tanımlamıştır”.

Süt içerisinde bulundurduğu bileşenler ile yararlı ve iyi besin kaynaklarından biridir (Coşkun ve ark., 1990). Ayrıca süt içerisinde bulundurduğu besin maddelerinden dolayı mikroorganizmalar için mükemmel bir ortam oluşturmaktadır. Ancak bozulması kolay olduğu için değerini kaybedebilen nitelikte bir üründür. Hijyenik sağlıkların

gerçekleştirilemediği, soğuk zincirlerin kurulamadığı, iklimin sıcak ya da ılıman olduğu bölgelerde süt kısa sürede bozulabileceği için daha dayanıklı süt ürünleri halinde işlenip değerlendirilmelidir (Güven, 1993).

Süt ve süt ürünlerine bağlı hastalıkların % 90'dan fazlası bakteriyel kökenlidir. Tifo, kızıl ve benzeri birçok hastalığın nedeni *Streptococcus pyogenes* ve *Salmonella typhi* isimli patojenlerdir. Bu bakteriler çiğ süte bulaştığından, 1940 yılından önce, tifo, kızıl gibi hastalıkların süt kaynaklı olduğu ve en sık görülen hastalıklar grubuna girdiği bilinmektedir. İkinci Dünya Savaşı süresince Brucella, Staphylococ ve Salmonella'nın neden olduğu gıda zehirlenmeleri insan sağlığını kötü şekilde tehdit etmiştir. Listeriozis, çiğ süt içerisinde bulunan ve ölümcül olabileceği düşünülen bir hastalıktır (McSweeney ve Fox, 2008).

Enfeksiyöz birçok hastalığın teşhisinde çoğunlukla doğrudan ve dolaylı yöntemler kullanılmaktadır. Hastalık etkeni olarak gözlemlenen bakterilerin izolasyon ve identifikasyonlarında konvansiyonel, klasik veya direkt teşhis yöntemleri kullanılmaktadır. Mikroorganizmanın sahip olduğu genetik materyallerin (DNA veya RNA) ya da proteinlerin saptandığı, hassasiyeti ve özgüllüğü oldukça yüksek olan daha hızlı, güvenilir ve kesin sonuçlar elde edilen biyoteknolojik ve moleküler teşhis yöntemlerinin kullanım alanları giderek artmaktadır (Saiki ve ark., 1988; Bilgehan, 2005).

DNA dizi analizi, DNA hibridizasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler ile gen klonlaması, genetik karakterizasyon, tür tespiti ve genetik araştırmalarda genomik DNA kullanılmaktadır (Özdil ve Başpınar, 2004). Süt örneklerinin toplanması, birçok materyale göre kolay ve masrafsız olduğundan genomik DNA'nın doğrudan süttten izole edilmesi için geliştirilen yöntemler kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında çiğ süt ve pastörize sütlerde bulunan mikroorganizmalardan olan *Bacillus cereus*'un DNA' sını izole edilmiş, *Bacillus cereus*'a ait gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile moleküler düzeyde genetik tür tespiti yapılmıştır. Bu çalışmada *Bacillus cereus*' un moleküler tür teşhisinde kullanılan

primerlerinden elde edilen verilerin, süt ve süt rnlerinde *B. cereus* tespitine yönelik çalışmalarda kullanılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan süt, sağlıklı koşullarda üretilmediği, işlenmediği, saklanmadığı ve gereken kontroller yapılmadığı takdirde insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır. Çiğ süt, bir veya birden çok sağımı yapılacak hayvanın (keçi, inek, koyun ve mandanın) sağılması ile elde edilmiş, 40 °C üzerinde ısı işlem görmemiş veya aynı değerde herhangi bir işleme tabi tutulmamış meme bezinden salgılanan kolostrum dışındaki sıvıdır. Çiğ süt çok sayıda ürünün hammaddesini oluşturmaktadır. Bu nedenle, işlem görmemiş çiğ sütler içerdiği başlangıç bakteri yükü büyük öneme sahiptir. Çiğ süt mikroflorasında çok fazla bakteri bulunmakta ve bundan dolayı süt kalitesi olumsuz etkilenmektedir. Teknolojik yönden, yüksek oranda bakteriye sahip sütlerin işlem görmesi güç olmakla birlikte ürün kalitesi düşmektedir (Alişarlı ve ark., 2003).

Süt ve süt ürünleri mikroorganizmaların gelişmesini sağlayacak ortam oluşturmaktadır. Hayvanların sağlık problemlerinden, elde edilen ürüne dönüşüncüye kadar geçen her aşamada çok farklı faktörler sütün hijyen kalitesine etki etmektedir (Kalkan ve Halkman, 2006). Çiğ sütte az sayıda bakteri olsa da sağıldıktan sonra çevresel faktörlerle bulaşan mikroorganizmaların etkisinden dolayı oldukça kısa bir sürede bozulma olur. Süt insanlarda da hastalıklara sebep olan birden çok patojenin kaynağını oluşturmaktadır. Bu nedenle çiğ süt, insan gıdasında doğrudan tüketime uygun olmamaktadır (Kalkan ve Halkman, 2006).

Pastörize süt ürünlerinin raf ömrünün kısılmasının en önemli sebebi, çiğ sütlere uygulanan depolanma sıcaklıklarıdır. Çiğ sütteki psikrofilik mikrofloranın miktarı ve çiğ sütün soğuma hızı önemli faktörler arasında görülmektedir. Proteolitik, lipolitik, psikrofilik aktivite ile bakterilerin enzim üretmeleri, sütte gözlemlenen değişiklikler, pastörizasyon öncesinde sütün uzun süre depolanması ile bağlantılıdır. Bu nedenle sütün işlendiği sırada ve süt ürünlerinin kalitesinin korunmasına bağlı olarak problemler yaşanması beklenmektedir (Burdova ve ark., 2002).

Birçok hastalık mikroorganizma kaynaklıdır. Bireysel olduğu gibi veba, kolera ve çeşitli tipten grip vakaları toplumu çok yakından ilgilendiren epidemik olaylar bir zamanlar yerleşim yerlerindeki insan ve hayvanların ölmesine sebep olmuştur (Kılıç, 2010). Gıda güvenliği açısından oldukça önemli olan *B. cereus* başta gıda zehirlenmeleri olmak üzere çok farklı sağlık problemlerine de neden olmaktadır. Son yıllarda *B. cereus* kaynaklı gıda zehirlenme sayılarında artış görülmektedir. Doğada yaygın olarak bulunan *Bacillus cereus* gram pozitif, çubuk şeklinde, aerob-fakültatif anaerob, spor oluşturan bir bakteridir (Granum, 1994). Polimiksine dirençli olan *Bacillus cereus*; jelatinaz, lesitinaz, amilaz ve proteaz aktivitesine sahip olmakla birlikte nitrat redüksiyonu pozitifdir. Tahıl anlamındaki cereal'dan *Cereus* adını almaktadır (Sekin ve Karagözlü, 1997).

Bacillaceae familyasında bulunan *B. cereus*, genellikle süt ve süt ürünlerinde, ette, baharatlarda, kurutulmuş gıdalarda, soslarda ve başta pirinç olmak üzere çeşitli tahıllarda ve yumurtada bulunmaktadır. Psikrotrof suşlarının varlığı ve spor oluşturmaları nedeniyle süt ve süt ürünlerinde oldukça önemli bir kontaminasyon kaynağıdır. *B. cereus* gıda hijyeni açısından önemlidir (Beecher ve Wong, 2000). *B. cereus* sporları nem, pH ve sıcaklık gibi farklı çevre koşullarına karşı yüksek direnç göstermektedir. Sporları hidrofobik özelliğe sahip olduğu için yüzeylere (alet-ekipman) çok çabuk yapışma özelliğindedir (Faille ve ark., 2007). *B. cereus* gıdalarda düşük seviyelerde bulunmasından dolayı önemli bir tehlike oluşturmamaktadır. Fakat *B. cereus* sporları gıdaların pişirme sıcaklıklarına karşı dayanıklıdır. Isıtılan gıdalarda bakteri vejetatif hale geçerek saklanması esnasında üremektedir. Genel olarak 10-50 °C sıcaklık arasında korunması sağlanan pişirilmiş gıdalarda, kısa bir süre içerisinde toksik madde üretebilir ve aynı zamanda kısa bir zaman içerisinde yüksek seviyelere ulaşabileceği görülmüştür (Granum, 1994). Bundan dolayı *B. cereus*, gıda güvenliğini tehlikeye attığı için önemle üzerinde durulan bir bakteridir. *B. cereus* iki çeşit gıda zehirlenmesine (diyareal ve emetik formda) neden olmaktadır. Son yıllarda *B. cereus* kaynaklı gıda zehirlenme sayılarında artış gözlemlenmiştir.

B. cereus ile kontaminasyona uğramış gıda maddeleri pişirilme işleminden sonra yeterince hızlı bir şekilde soğutulmazsa veya gıdaların hazırlanması ile birlikte tüketimi

arasında geçen süre uzarsa, canlı ve ısıya direnç gösteren sporların vejetatif hale dönüşmesi neticesinde mikroorganizmaların çoğalması ve gıda zehirlenmesine sonuç olabilecek düzeyde toksin maddenin oluşması mümkün olmaktadır (Okahisa ve ark., 2008; WHO, 2008).

B. cereus sporları, diğer *Bacillus* cinsi bakteri sporlarına oranla daha hidrofobik yapıda olduğundan gıda işleme süreçlerinde alet-donanım ve yüzeylere yapışma eğilimindedir. *B. cereus* sporları, süt ve süt ürünlerinin 63 °C' de 30 dakikalık pastörizasyonu sırasında canlı kalabilmektedir. *B. cereus*'un psikrotrof serotipleri ile kontaminasyona uğrayan süt ve süt ürünlerinin soğukta muhafaza sıcaklığında toksin oluşturması halk sağlığı açısından risk oluşturmakta, proteinleri parçalayarak gıda maddelerinin bozulmasına neden olmakta ve önemli ölçüde maddi kayıplara sebebiyet vermektedir (Özdemir, 2003).

B. cereus süt endüstrisinde sıklıkla görülen oldukça önemli bakterilerden biridir. *B. cereus* bakterisinin sporlarının, hidrofobik yapılarından dolayı yüzeylere yapışabilme, germinasyon, çoğalma ve tekrar sporlanma özelliğine sahiptir. Bunların yanı sıra sporlarının pastörizasyon sıcaklığında canlılığını koruyabilmesi ve psikrotrofik ve 4-6 °C gibi düşük sıcaklıklarda gelişebilme özelliğinden dolayı süt ve süt ürünlerinde sıklıkla rastlanılmaktadır (Andersson ve ark., 2004; Çöl, 2014).

Psikrofilik bakteri olan *B. cereus*'un salgılamış olduğu proteaz enzimleri çiğ sütün işlenmesi esnasında stabilitelerini koruyabilmekte, enzimin miktarına ve aktifliğine bakılarak kısa bir zaman işlem görmüş süt ürünlerinde pıhtılaşma meydana gelmektedir. Bunun sonucunda ürünlerde kalite kaybı olmakta ve raf ömrü kısalmaktadır. *B. cereus*'un farklı çeşitlerdeki gıda örnekleri üzerindeki sayımının gerçekleştirilmesinde agar besiyeri olan Mannitol Egg Yolk Polymyxin önerilmekte olup, bu besiyeri üzerinde sanayiden gelen veriler *Bacillus cereus* seçiciliğinin yeterli olmadığını göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı işlenmiş süt ürünlerindeki kalite kayıplarının önüne geçilebilmesi için çiğ sütlerde bulunan gerçek *Bacillus cereus* varlığının ve

sayısının doğru ve tam şekilde tespit edilmesi gerekmektedir (Kalkan ve Halkman, 2006).

Hollanda'da yapılan bir çalışmada evdeki buzdolaplarında muhafaza edilen pastörize yağsız sütlerde *B. cereus*'un bulunma sıklığının % 33 oranında olduğu saptanmıştır (Van Netten ve ark., 1990). Ayrıca muhafaza süresi ve sıcaklığındaki artışla birlikte *B. cereus* sayısında da artış olduğu belirtilmiştir.

Farklı bir araştırmada ise *B. cereus* düzeyinin çiğ sütlerde % 48, pastörize sütlerde % 9, çedar peynirinde % 35, dondurmada ise % 14 olduğu tespit edilmiştir (Ahmed ve ark., 1983). Bölgesel olarak yapılan başka bir çalışmada da fermente sütte % 17, dondurmada % 52, yumuşak peynirde % 35, pastörize sütte % 2, süt tozunda % 29 oranında *B. cereus* saptanmıştır (Wong ve ark., 1988). Süt tozu ve bebek mamalarının sıklıkla *B. cereus* ile kontamine olabileceği de ifade edilmektedir. Toplam 17 ülkeye dağıtılan 26 adet bebek mamasında yapılan kontrollerde *B. cereus* sayısının limit değerler üzerinde olmasından dolayı mamalar geri toplatılmıştır. Yapılan analizlerde *B. cereus* sayısının 600 kob/g' ye ulaştığı tespit edilmiştir (Becker ve ark., 1994).

Elazığ ilinde çeşitli marketlerde satışa sunulan 16 farklı firmaya ait UHT sütlerdeki; toplam mezofilik bakteri sayısı ve *Bacillus cereus* varlığı tespit edilmiştir (Tektemur, 2010). *Bacillus cereus* seçici agar besiyeri üzerinde yapılan *Bacillus cereus* taraması sonunda; 16 süt örneğinden elde edilen toplam 52 adet koloni *Bacillus cereus* olma ihtimali sebebiyle biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Yapılan biyokimyasal testler sonucunda 52 adet koloninin 38 tanesi (% 40) *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır.

Murindamombe ve ark. 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada Gaborone ve Botsvana'da satılan sokak gıdalarının mikrobiyolojik güvenliğini ve kalitesini değerlendirmişlerdir. Toplam 148 satış noktasından kompozit sokak gıda örneği alınmış ve analiz edilmiştir. Çeşitli sokak gıdalarının *Bacillus cereus* ile kontaminasyon seviyesine odaklanılmıştır. Tüm örneklerde *B. cereus* (vejetatif ve sporlar)'un, toplam spor ve toplam yaşayabilir sayımlar belirlenmiştir. Gıda örneklerindeki *B. cereus*

izolatları, biyokimyasal profilleri ve enterotoksijenik özelliklerine göre karakterize edilmiştir. Satış noktasındaki yiyecekler için *B. cereus* kontaminasyon oranının % 65 olduğu tespit edilmiştir. *B. cereus* sayıları saptanamayan durumdan 9.1 kob/g'ye kadar yüksek seviyelere kadar değişmiştir. Bazı numunelerin yüksek kontaminasyona rağmen çoğu numunede *Bacillus* varlığı saptanmıştır. Çalışmanın sonuçları, *B. cereus* izolatlarının % 59.6' sının enterotoksijenik olduğunu ortaya çıkarmıştır

Gıda mikrobiyolojisinde tür identifikasyonundan ziyade şüpheli izolatın patojenite açısından karakterize edilmesinin önem kazanması ve moleküler tekniklerle izole edilen suşların patojenite ve toksijenite özelliklerinin genetik düzeyde tanımlanabilmesi, söz konusu yöntemlerin önemini giderek arttırmaktadır. Buna bağlı olarak, son yıllarda bakterilerin tanımlanmasında kullanılan genotipik yöntemler, fenotipik yöntemlere göre tiplendirilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve differensiyasyon bakımından daha üstün yöntemlerdir. Ayrıca, geleneksel analiz metotlarında moleküler yöntemlere göre istatistiksel ve metodolojik hata olasılığının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan geleneksel analiz yöntemleri ile izolasyon ve adlandırma için gerekli süre uzun olup, laboratuvar yükünün daha fazla olduğu ifade edilmektedir (Moter ve Gobel, 2000). Buna ek olarak bazı kurumlarda ve kuruluşlarda moleküler mikrobiyoloji teknikleri ile ilgili eğitimler yapılmakta olup bunun sonucunda moleküler tanımlama yöntemleri kullanılan çalışmaların önünü açacağı düşünülmektedir (Yetilmezler, 2010).

Günümüzde gıdalardaki *B. cereus* toksinlerinin teşhisi ve adlandırılması için PCR, ELISA, ticari kitler ve farklı hücre kültürlerine dayalı testlerden faydalanılmaktadır (Wehrle ve ark., 2009; Çöl, 2014).

Türkiye' de gerçekleştirilmekte olan araştırmalarda en fazla kullanılan moleküler tanımlama yöntemlerinin başında Darbeli Alan Jel Elektrofrezisi gelmektedir (Us ve ark., 2011). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Koluman 2010; Oktay ve Hepekran, 2010; Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011) ve 16S rDNA dizisinin analizi (Osmanağaoğlu ve ark., 2010; Adıgüzel ve ark., 2011) gelerek bunlara her yeni günün ardından moleküler teknik içeren çalışmaların eklendiği görülmektedir.

Son yıllarda acil tanı ve tedavi gerektiren ya da bakteri kültüründe zor üretilen ve geç üreme gösteren mikroorganizmaların tanımlanması için, klinik örneklerden yeterli miktarda mikroorganizma DNA'sının izolasyonu gerçekleştirildikten sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonu temeli içeren testler kullanılmaya başlanmıştır. PCR uygulaması üzerine çalışma yapılacak olan genetik materyal az miktarda ve birbirinden bağımsız DNA molekülleri gözlemlense bile çoğalma gösterebilir. Kullanılan DNA materyalinin homojen bir hale gelmesi sağlanır bunun sonucunda kolayca tanımlanması yapılabilir (Kahya ve ark, 2013).

Polimeraz zincir reaksiyonu virüs, fungus, bakteri, protozoo, parazit ve benzeri hastalık etkenlerine ait hedefteki nükleik asit zincirlerinin, primerler (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimler kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir. Yavaş üreyen ve teşhisi uzun süre alan doğal konakların ve mikroorganizmaların dışında üretimi zor olan bundan dolayı tespiti yapılamayan mikroorganizmaların teşhisinde PCR'nin kullanımının önemi giderek artmaktadır. PCR ile birbirine alt tipler arasında veya yakın çeşitler arasında ayırma işlemi yapılabilir ve klinik örneklerde ön zenginleştirme yapılmaksızın hızlı şekilde sonuca varılabilir (Sachse, 2004).

Yapılan bir araştırmada, sığır sütlerinde *Listeria monocytogenes* ve *Brucella abortus* suşlarının moleküler tanımlamalarının gerçekleştirilmesi için PCR koşulları optimize edilmiştir. Bakteriyel DNA ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılacak olan optimizasyon koşulları için, belirli miktarda bakteriyle inokule edilmiş olan yağlı ve yağsız süt örnekleri üzerinde kaynatma ve spin-kolon tekniği yöntemleri kullanılmıştır. Ekstraksiyon DNA kaynatılarak gerçekleştirildiğinde, yağlı ve yağsız süt örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonunun *B. abortus* bakterisinde minimum seviyede saptama değerleri sırasıyla 370 ve 340 kob/ml olduğu tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* bakterisine bakılacak olursa minimal saptama değeri yağlı sütte 40 kob/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca bağlı olarak farklı bakterilerdeki süt parçaları ile etkileşimlerinin farklı olmasından kaynaklı, PCR yapılabilmesi için süt örneklerinin kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu ve Kalsiyum (Ca)'a bakılarak yüksek oranda

Magnezyum (Mg) yoğunluğunun, sütteki bakterin tanımlanmasında PCR sonuçlarını olumlu olarak etkilediği bildirilmiştir (Yetilmezler, 2010).

Bacillus cereus önemli bir besin patojenidir. *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. mycooides* grubu hücreleri birçok fenotipik özelliği ve yüksek bir kromozomal dizi benzerliği paylaştığından gıdalardan izole edilmiş *B. cereus* suşları ve gıda zehirlenmesi salgınlarıyla ilişkili örnekler dahil olmak üzere grup hücrelerinde *B. cereus* için gen profilleri araştırılmıştır. Bu araştırma için hemolizin BL, *B. cereus* enterotoksin T ve enterotoksin FM gibi enterotoksin genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu metotları ile test edilmiştir. Sonuçlar, toplanan 98 *B. cereus* grubu suşları için 12 enterotoksijenik profil olduğunu göstermiştir. *B. cereus* grubu hücrelerinde üç tip enterotoksin varsa bu hücrelerin CHO hücrelerine sitotoksik olduğu gösterilmiştir. *B. cereus*, *B. mycooides* ve *B. thuringiensis* suşları arasında benzer enterotoksijenik profiller bulunabilir. Bu nedenle, tüm *B. cereus* grubu suşları potansiyel olarak toksijenik olabilir ve bu hücrelerin yiyeceklerde tespiti önemlidir. *B. cereus* hücrelerinin sfingomyelinaz geninden Ph1 / Ph2 olarak adlandırılan PCR primerler tasarlanmış, tüm *B. cereus* grubu suşları için spesifik ve gıda numunelerinde kontamine olmuş *B. cereus* hücrelerinin tespiti için kullanılabilir oldukları bildirilmiştir (Hsieh ve ark., 1999).

Corona ve ark. (2003), *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus anthracis*'in hastalığın sıklığı veya ciddiyeti açısından gıda güvenliği için temel endişeler içermekte olduğunu belirtmişlerdir. Aynı grubun üyesi olan ve DNA homolojisini daha büyük ölçüde paylaşan, farklı gıda ve çevresel kaynaklardan spesifik tespit ve tanımlama teknikleri araştırmışlardır. Bu organizmaları toksin genlerini hedefleyerek dahili amplifikasyon kontrolü (IAC) olmadan tespit etmek için çok sayıda bireysel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve birkaç multipleks PCR (mPCR) yöntemi kullanmışlardır. Bu nedenle, enterotoksik *B. cereus* grubu suşlarının saptanması için IAC ile bir mPCR'yi denemiş ve buradaki *hblA*, *nheA* ve *cytK* genlerini seçmişlerdir. Bu nedenle isale neden olan *IA* ve *pag* genlerini gösteren primerlerin kullanımı ile doğal olarak kontamine pirinç bazlı bulaşık ve süt numunelerinde mPCR ile de tespit edilebilir olduğunu belirtmişlerdir. Geliştirilen yüksek verim ve uygun maliyetli mPCR yöntemi

ile enterotoksik *B. cereus* grubu organizmaların eşzamanlı, hızlı ve güvenilir tespiti için güçlü bir araç sağladıklarını ortaya koymuşlardır (Corona ve ark., 2003).

Batchoun ve ark. (2011) Ürdün'de farklı gıda satan restoranlar ve market işletmelerinden toplamış oldukları 202 adet farklı gıda örneklerinden 47 adedinde (% 23.3) *B. cereus* bakterisine rastlamışlardır. PCR taramaları sonucunda pozitif çıkan 47 adet numuneden 19'unun (% 36.5) Hbl komponentini kodlayan her üç geni (*hblADC*), 27'sinin (% 51.9) ise Nhe komponentini kodlayan üç genide (*hblADC*) içerdiğini saptamışlardır. *cytK* genini % 53.8 oranında bulunduğu ve *ces* geninin ise sadece 4 numunede (% 8.51) bulunduğu saptanmıştır. Aynı durumda *ces* geni bulunduran izole edilmiş numunenin hepsinde *nhe* geni içerdiğini, *hbl* genini ise içermediğini tespit etmişlerdir.

Farklı bir çalışmada (Chavez ve ark., 2011) tüketime hazır yemek, bebek maması, baharat vb. kaynaklı zehirlenme sonuçlarından elde edilen bilgilere göre; 97 tane *B. cereus* suşundan 82 adedinin (% 84.5) Nhe genini kodlayan her üç geni de içerdiği (*nheABC*), 61 adedinin (% 62.9) Hbl genini kodlayan yine üç geni de (*hblADC*) içinde bulundurduğu ve 44 tanesinin *cytK* genini (% 45.4) içerdiği tespit edilmiştir. Ancak emetik toksinden sorumlu *ces* geni saptanmamıştır. Brezilya'da incelenen örneklerde *cytK* geninin ülkemizle kıyaslandığında daha yüksek oranda bulunması bu genin dağılımının belirli bölgelerde sınırlı olması ve analiz yapılan gıda numune içeriklerinin farklılık göstermesinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir.

Bir diğer araştırmada Çadırcı ve ark (2013), *Bacillus cereus* varlığını araştırmak ve mültepleks PCR tekniğini kullanarak sütlü tatlı örneklerinde enterotoksijenik genleri tespit etmişlerdir. Toplam 100 adet sütlü tatlı örneğinden 3 adet tavuk göğsünde (% 25), 2 adet supanglede (% 6.6), 1 adet keşkülde (% 4) ve 1 adet sütlaçta (% 5.8) olmak üzere 7'sinde *B. cereus* kontaminasyonu bulunmuştur. Çalışmada 7 pozitif örnekten toplam 20 izolat toplanmıştır. PCR sonuçları, *B. cereus* izolatlarının % 30'unun (6/20) *hblA*, *hblC* ve *hblD* kodlayan üç enterotoksik HBL kompleksi genini içerdiğini, % 70'inde (14/20) *hbl* geni olmadığını göstermiştir. *CtyK1* geni hiçbir

numunede tespit edilememiştir. Sütü tatlılarda *B. cereus* ve enterotoksijenik genlerinin varlığı halk sağlığı için potansiyel bir risk olabileceğini ve *B. cereus* varlığının PCR taramaları ile tespit edilebileceğini belirtmişlerdir.

Aragon-Alegro ve ark. (2008) Brezilya'da yapmış oldukları çalışmada *Bacillus cereus* patojeninin ishal ve emetik sendromlar olarak bilinen iki farklı toksin aracılı gıda kaynaklı hastalığa neden olduğunu belirtmişlerdir. İshal sendromu üç farklı enterotoksin gen bölgesi ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmada 155 adet *B. cereus* suşunda yapılan PCR çalışmalarının sonucunda *hbl* genin % 67.7 oranında, *nhe* genin ise % 99.4 oranında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. *cytK* ve *ces* genlerine ise rastlamadıklarını belirtmişlerdir.

Birçok *Bacillus cereus* suşu gastrointestinal hastalıklara neden olur ve yakından ilişkili böcek patojeni *B. thuringiensis* de ishal salgınlarında rol almıştır. İshalli hastalık türleri enterotoksinlere bağlanır. İki farklı enterotoksik protein kompleksi, hemolisin BL (HBL) ve hemolitik olmayan enterotoksin (NHE) ve bir enterotoksik protein, enterotoksin T karakterize edilmiştir ve genler dizilmiştir. Bu genlerin tespiti için PCR primerleri geliştirilmiştir ve 22 *B. cereus* ve 41 *B. thuringiensis* suşlarında genleri tespit etmek için kullanılmıştır. Her iki protein kompleksi HBL ve NHE'nin her birinin en az bir geni, *B. thuringiensis* suşlarının hepsinde saptanırken, altı *B. cereus* suşu, üç NHL geninden en az ikisinden olmadığı gözlemlenmiş olup üç HBL geninin de hepsinden yoksun olduğu tespit edilmiştir. Beş farklı primer seti kullanılmış olup enterotoksin T kodlayan genin saptanması için yapılan PCR analizi sonuçları, Southern analiziyle de teyit edilerek *bceT* genini açıkça tespit etmişlerdir. *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'de enterotoksin kodlama genlerinin tespiti için yapılan 16S-23S rRNA geninin PCR analizi, çalışılan tüm suşlar için aynı desenleri ortaya çıkarmıştır (Hansen ve ark., 2001).

Hemolizin BL (HBL), *Bacillus cereus* grubu suşları için önemli bir virülans faktörüdür. Aynı zamanda en sık kullanılan *B. cereus* saptama kiti için bir hedef enterotoksindir, yani *B. cereus* enterotoksin (ishal tipi) için test kitidir. Bununla birlikte,

B. cereus grubu suşları için HBL aktiviteleri sitotoksinite araştırması sonucunda *B. cereus* grubu suşlarının sadece bir kısmında HBL'nin aktif olmasına rağmen, tüm suşların sitotoksinite gösterdiğini belirlenmiştir. Bu nedenle, sadece HBL'nin değil, *B. cereus* grubu suşlarının da saptanmasına izin veren yöntemlerin kullanımının daha doğru olduğu belirlenmiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada (Hsieh ve ark., 2000). *B. cereus* grubu ve diğer bakteri suşları için 16S rRNA'nın gen sekanslarının karşılaştırılmasıyla, tüm *B. cereus* grubu suşlarına spesifik B16S1 ve B16S2 primerlerini tasarlamışlardır. Ek olarak, HBL majör bir enterotoksin olduğu için, HBL genine özgü polimeraz zincir reaksiyonu primerleri olan Hm1 ve Hm2'yi de tasarlamışlardır. B16S1/B16S2 ve Hm1/Hm2 primerlerini, *B. cereus* grubu hücrelerinin eşzamanlı olarak saptanması ve HBL enterotoksinlerinin olası varlığı için bir multipleks PCR sisteminde birleştirmişlerdir. Geliştirilen primerler ile yapılan PCR taramaları ile PCR' den önce 8 saatlik bir zenginleştirme aşaması gerçekleştirilmişse, gıda örneği başına 10 kob/g *B. cereus* hücrelerinin saptanmasını sağlamıştır (Hsieh ve ark., 2000). Bir diğer çalışmada hemolizin HblA kompleksinin PCR yöntemiyle taranmasının, enterotoksin üretiminin RPLA enterotoksin kiti ile yapılan testlerden daha hızlı tespit edilmesine izin verdiği sonucuna varılmıştır (Mantynen ve Lindström, 1998).

Bacillus cereus, gram pozitif, endospor oluşturan patojen bir bakteridir ve çevrede her yerde bulunur ve sıklıkla emetik ve ishal gibi gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkilidir. Ankolekar ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada marketlerden elde edilen 178 çığ pirinç örneğinin *B. cereus* sporlarının varlığı açısından analiz etmişlerdir. *Bacillus* türünün sporları, ortalama 32.6 kob/g ile *B. cereus* için 3.6-460 kob/g ve *Bacillus thuringiensis* için 3.6-23 kob/g konsantrasyonlu pirinç örneklerinin 94'ünde (% 52.8) bulunmuştur. Toplam 94 izolatın 83 adedi *B. cereus* ve 11'i *B. thuringiensis* olarak tanımlanmıştır. PCR kullanılarak izolatlar, hemolizin BL (HBL) kompleksinin cereulid sentetaz geni (ces), hblA ve hblD genlerinin ve hemolitik olmayan (NHE) enterotoksin kompleksinin nheA ve nheB genlerinin varlığı açısından kontrol edilmiştir. Örneklerin hiçbirinde ces geni tespit edilmediğini belirtmişlerdir. Aksine 47 örneğin (% 56.6) *B. cereus* izolatında hblA ve hblD genleri ve 74 adedinin (% 89.1) izolatında ise nheA ve nheB genlerinin mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Ticari tahlil kitleri tarafından belirlendiği üzere, 83 adet *B. cereus* izolatının 44 adedinde (% 53.0) hem NHE hem de

HBL enterotoksinleri ürettiğine rastlamışlardır, 78'nin ise (% 93.9) biri ya da diğeri için pozitif sonuç vermiştir. Çalışmanın sonucunda ise *Bacillus* bakterisinden kaynaklı ABD'de gıda kaynaklı olduğunu hastalıkların ve bakterinin PCR tekniği ile tespit edilebileceği bildirilmiştir (Ankolekar ve ark., 2009).

Bacillus cereus' un büyük ölçekli analizi için bir RAPD-PCR prosedürü geliştirilmiştir. Veri toplama ve işleme için bilgisayarlı bir sistem kullanılarak, büyük ölçekli araştırmalar için RAPD modellerini ele alan yeterli bir sistem elde edilmiştir. Prosedür, *Bacillus cereus* suşlarının tespiti için oldukça ayırt edici olmuştur. Ayrıca bu prosedürün beş referans suş için RAPD parmak izlerinin tekrarlanabilir sınıflandırmasına imkan tanıdığı bildirilmiştir (Nilsson ve ark., 1998).

Choo ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada, Kore'den satın alınan 140 kurutulmuş kırmızı biber numunesini, standart kültür yöntemine göre *B. cereus* varlığı açısından test etmişlerdir. Geleneksel biyokimyasal doğrulama testlerine alternatif olarak *B. cereus*' un hızlı doğrulanması için bir PCR testi geliştirilmiştir. *B. cereus* izolatlarının genetik çeşitliliği DNA RAPD tayini kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan PCR taramaları sonucunda kurutulmuş kırmızı biber numunelerinin % 84.3' ünde ortalama 1.9×10^4 kob/g konsantrasyonu ile *B. cereus*' u tespit etmişlerdir.

Bacillus cereus' un hızlı ve güvenilir amacıyla SYBR Green I'e dayanan bir multipleks gerçek zamanlı PCR analizi geliştirilmiştir (Wehrle ve ark., 2010). İshalden (nheA, hblD ve cytK1) ve kusmadan sorumlu toksin genlerine özgü primerler tasarlanıp seçilmiştir. Testin uyarlanmış bir versiyonu, toplam 113 suş kullanılarak Light Cycler 480 üzerinde başarıyla gerçekleştirilmiştir. PCR sonuçlarının geleneksel PCR, immüno-tahliller ve sitotoksisite testleri ile doğrulanması, genel olarak mükemmel bir korelasyon vermiştir. Farklı erime tepeleri sadece *B. cereus* ve *B. cereus* grubu suşlarında gözlenirken diğer *Bacillus* ve Gram-pozitif veya Gram-negatif bakterilerde görülmemiştir. Çalışma sonucunda, yeni multipleks gerçek zamanlı PCR, enteropatojenik potansiyele sahip *B. cereus*' un tanımlanması için güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Wehrle ve ark., 2010).

Smith ve ark. (2004) perakende mağazalardan elde edilen beş tavuk eti ürününden alınan numuneler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, toplam 60 numunenin 27'sinde *B. cereus* tespit etmişlerdir. Dondurulmuş ve buzdolabında saklanan ürünler, uygun olduğu şekilde gece boyunca kendi ortamlarında tutulmuştur. Tavuklardan elde edilen izolatlardan PCR ile *bceT*, *nheABC*, *hblACD* ve *cytK* toksin kodlayıcı genlerin varlığı açısından test edilmiştir. Sonuçlar, bu çalışmada test edilen beş perakende kümes hayvanı ürününün dördünde *B. cereus* organizmalarının bulunduğunu, tam olarak pişirilmiş üç ürün, özellikle de iki ürün için bildirilen en yüksek oranlara sahip olduğunu göstermiştir. İzole edilen tüm suşlar, toksinlerden en az biri için gen içermesine rağmen, suşların hiçbirinin *cytK* genini içermediği test saptanmıştır (Smith ve ark., 2004).

Süt endüstrisi için önemli bir endişe kaynağı olan bir gıda patojeni olan *Bacillus cereus* suşları Cezayir'deki bir süt fabrikasında pastörize süt işleme hattından izole edilmiştir. *B. cereus* suşları arasındaki ayrımın yapılmasının amacı gıda zehirlenmesi potansiyellerini öngörülebilecek olmasıdır. Suşlar için M13-PCR ile DNA parmak izi yöntemi uygulanmıştır. Çoğaltılan *panC* gen dizisi analizi ile filogenetik grup seviyesinde tanımlama yapılmıştır. Üç ayrı M13-PCR grubu elde edilmiştir. Hem işlem ekipmanından hem de süt tozundan elde edilen suşların, başlangıçtaki kontaminasyonun ana kaynağı olan süt tozundan ortaya çıktığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, süt tozunda ve ikincisi süt işleme sistemleri tarafından tanımlanan *B. cereus* suşları arasında çok düşük bir genetik çeşitlilik gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca *B. cereus* bakterisinin 4 yıl boyunca süt ürününde bulunduğu da belirlenmiştir (Malek ve ark., 2013).

Bir başka çalışmada (Çöl, 2014) ise toplam 673 gıda örneğinde *B. cereus* varlığı ve toksinleri açısından inceleme yapılmıştır. İstanbul ve çevresinde bulunan illerdeki süpermarket, otel ve restoranlardan toplanmış 210 adet bakliyat, 150 adet tüketime hazır halde meze ve yemek, 75 adet pastaneden alınmış ürün, 78 adet baharat ve 160 adet bebek maması örnekleri incelenmiştir. *B. cereus* varlığının tespiti için toplanan örnekler uygun koşullar içerecek şekilde laboratuvara getirilerek ISO 7932 (2004)'e göre analiz edilmiştir. Çalışmada farklı olarak ELISA yöntemide kullanılmış olup hücre kültürlerine dayalı sitotoksinite testleri ve konvansiyonel PCR yöntemlerinden

yararlanılarak, sitotoksik etkileri ve toksin tiplerini belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada incelenen 673 gıda örneğinden 91 (% 13.52)' inde *B. cereus* varlığı tespit edilmiştir. Seçilen pozitif 91 izolatta *B. cereus* toksinlerinin oluşumundan sorumlu genlerden 88 (% 96.7)'inde nhe geni, 57 (% 62.63)'sinde hbl geni, 2 (% 2.19)'sinde ces geni ve 3 (% 3.29) izolatta cytK geni olduğu saptanmıştır. PCR sonuçlarının ELISA ve sitotoksinite test sonuçları ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda *B. cereus* varlığının tek başına gıda kaynaklı hastalık oluşturma riskini ortaya koymada yetersiz kaldığı, patojenik *B. cereus* tespitinde toksin varlığı ve toksin oluşturan genlerin araştırılmasının önemli olduğu ifade edilmiştir (Çöl, 2014).

Yapılan araştırmalar, *Bacillus cereus* grubu üyelerinin başta gastrointestinal olmak üzere somatik hastalıklara neden olma potansiyeline sahip genleri taşıdığını göstermiştir. *B. cereus* grubu bakterilerinin neden olduğu hastalıkların çoğunun nispeten çok ciddi olması nedeniyle *B. cereus* grubu üyelerinin gıda ve çevre güvenliği açısından tespit edilmesi gerekmektedir. Hansen ve ark. (2001) tarafından yapılmış bir çalışmaya göre hedef olarak 16S rDNA kullanılarak *B. cereus* grubunun saptanması için bir PCR analizi geliştirilmiştir. *B. cereus* grubu bakterilerin 16S rDNA'sı için spesifik primerler seçilmiş ve PCR prosedür kontrolü olarak 16S rDNA için konsensüs primerleri ile kombinasyon halinde kullanılmıştır. *B. cereus* grubu bakterisinden DNA varlığında, PCR'de *B. cereus* spesifik fragmentler gözlemlenirken, *B. cereus* olmayan prokaryotik DNA varlığında, ortak 16S rDNA'ya ait fragmentler gözlemlenmiştir, böylece PCR analizinin özgüllüğü doğrulanmıştır (Hansen ve ark., 2001).

B. cereus' un direk tespitine yönelik bir çift primerin (BCFW1 ve Brevnew) kullanıldığı çalışma sonucunda, gıda matrikslerinden etkili bir DNA ekstraksiyonu ile hızlı ve türe özgü PCR metodunun kullanılmasının kullanışlı ve hızlı protokoller sunduğu bildirilmiştir (Manzano ve ark., 2003).

Bacillus cereus bakterileri önemli derecede genetik benzerlik göstermektedir. Bu nedenle *Bacillus cereus* grubu etkili bir şekilde ayırmak ve tanımlamak için gryB ve groEL genlerini teşhisi için farklı markörlerin kullanıldığı bir multipleks PCR yöntemi

eş zamanlı tespit için geliştirilmiştir. Yapılan taramalar sonucunda tüm *Bacillus cereus* grubu bakterilerinin groEL geni için 400 bç'lik bir ampikon, *Bacillus cereus*'ta 475 bç ampikon, *B. thurigiensis*' de 299 bç ampikon ve gryB geni için *B. mycoide*'de 604 bç ampikon verdiği tespit edilmiştir. Multipleks PCR testi kullanılarak *B. cereus* gibi tanımlanmasının özgüllüğü ve duyarlılığı, farklı türde gıda örnekleri ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak önerilen multipleks PCR'nin, tek bir tüpteki gıda örnekleri *B. cereus* grup bakterilerinin eş zamanlı olarak tanımlanması için güvenilir, basit, hızlı ve etkili bir yöntem olduğu ifade edilmiştir (Park ve ark., 2007).

Banykó ve ark. (2009), ham ve pastörize sütlerde *Bacillus cereus* ve *Bacillus licheniformis*'in suşa spesifik tespitini yapmışlardır. Rasgele seçilmiş *Bacillus spp* izolatları türlerin tekrarlayan dizi elemanlarına yönelik tek primerin kullanıldığı PCR analizine tabi tutulmuştur. İzolatlar altı farklı parmak izi modeline ayrılmıştır. İzolatlar sırasıyla % 82 ve % 83 benzerlikle iki ana gruba ayrılmış ve yaklaşık % 57 benzerlik seviyesinde kümelenerek gruplandırılmıştır. Ham ve pastörize sütlerde *B. cereus* ve *B. licheniformis*'in her ikisinin de aynı suşlarla kontaminasyonunun yanı sıra farklı suşlarla (çiğ süt ve yoğurt / pastörize süt ve yoğurtlarda) kontaminasyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak PCR analizinin mandıra ortamında *Bacillus* popülasyonlarının karakterizasyonu için kullanışlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Analiz edilen sınırlı sayıdaki suşa rağmen, iki *Bacillus* türü için yeterli düzeyde tespit edilebilir bantlama profilleri elde edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

Farklı işletmelerden antibiyotik kullanmadığı bilinen sağlıklı sığırlardan alınan 11 adet taze süt örneği ile iki adet pastörize süt örneğinde *Bacillus cereus* mikroorganizması moleküler düzeyde tespit edilmiştir. Çalışmada numaralandırılan sütlerden 1-11 numaralı örnekler çiğ süt numunelerine ait olup, 12 ve 13 numaralı örnekler ise pastörize sütlerden alınan örneklerdir.

3.1. Bakterinin Üretilmesi

Kullanılan Besiyerleri: Çiğ süt örneklerinden 10^{-5} olacak şekilde seyreltilerek alınan 1 ml'lik seyreltilmiş süt örnekleri *Bacillus cereus* bakterisinin çoğaltılması amacıyla MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) agar seçici besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır (Şekil 3-1). Etüve konularak 37 °C' de 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen kolonilerin morfolojik olarak test edilmesi sonucunda, koloniler LB besiyerine alınmıştır. LB'de 37°C 150 devir/dk' olacak şekilde bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3-2). Beklenen süre sonunda oluşan kolonilerden DNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-1 *Bacillus cereus*' un katı besiyerde üreme görüntüsü



Şekil 3-2 *B. cereus*'un katı besiyerden sıvı besiyere aktarımı ve üreme görüntüsü

MYP Katı Besiyerin Hazırlanışı

MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) Dehidre besiyeri 10.75 g/L olmak üzere ısıtılarak 225 ml'lik distile edilmiş su içerisinde eritilmiştir. Otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Otoklav çıkışında 45-50 °C' ye soğutulmuş, steril plastik petri kutularına 12.5'er ml dökülmüştür.

LB Sıvı Besiyerinin Hazırlanışı

LB (Luria Bertani) Dehidre besiyeri 12.5 g/L olacak şekilde ısıtılarak 500 ml'lik distile edilmiş su içerisinde eritilmiştir. Otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Otoklav çıkışında 45-50 °C' ye soğutulmuş, steril 15 ml'lik falkon tüplerine alınmıştır.

Seyreltme için Serum Fizyolojik Suyun Hazırlanışı

Seyreltme için 4.25 g NaCl (Sodyum Klörür)'e 500 ml distile edilmiş su içinde eritilerek pH dengesi 6.8-7.4 olarak ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Her süt ekimi sırasında 10^{-5} olacak şekilde 15 ml'lik falkon tüplerinden kullanılmıştır.

3.2. Moleküler Tür Tespiti

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Spin Kolon (Qiagen DNA Kiti) DNA ekstraksiyonu aşağıda verilen protokole göre yapılmıştır.

- LB besiyerinde hazırlanan bakteri kültürü 1.000 ul olacak şekilde ependorf tülere alınarak 10.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiş, süre sonunda üst faz atılıp pelet alınmıştır.
- Üzerine 200 µl PBS ve 20 µl Proteinaz K eklenmiştir.
- 200 µl AL buffer eklenerek vortekslenmiş ve 56 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 200 µl etanol (% 96-100) eklenerek vortekslenmiştir.
- Karışım 2 ml spin kolonlu koleksiyon tüpüne alınmıştır.
- 8.000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon yeni koleksiyon tüpüne alınıp üzerine 500 µl AW1 buffer eklenmiştir.
- 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, sıvı koleksiyon tüpüne geçirilmiştir.
- Spin kolon yeni koleksiyon tüpüne alınmış ve 500 µl AW2 buffer eklenmiştir.
- 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip, sıvı koleksiyon tüpüne geçirilmiştir.
- Spin Kolon yeni mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 200 ul AE buffer eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.
- 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip ve spin atılmıştır.
- DNA örnekleri PCR işlemleri yapılana kadar -20 °C' de template DNA olarak saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) işlemi BIO-RAD C1000 Touch Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3-3). DNA örneklerinin yürütülmesinde Thermo Scientific EC 1000 XL Power Supply Elektroforez sistemi, DNA ve PCR ürünlerinin yürütüldüğü jellerin görüntülenmesinde ise BIO-RAD ChemiDOC MP Görüntüleme sistemi (UV transilluminatör) kullanılmıştır (Şekil 3-4).



Şekil 3-3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan cihazlar



Şekil 3-4 Elektroferez jel görüntüleme cihazı

PCR fragmanları, etidyum bromür ilave edilmiş % 2' lik agarose jel elektroforezi ile 0.5 x TBE buffer tampon çözeltide 100 volt' da 30 dk boyunca yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir (Manzano ve ark., 2003). Agarose jeller (120 ml % 2' lik); 24 ml 5 x TBE, 96 ml ddH₂O, 2.4 g Agaroz ve 5 µl Etidyum Bromür (10 mg/ml) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Bu tezde kullanılan ve spesifik gen bölgelerini hedefleyen primer setlerine (IAC-F IAC-R, P-F P-R, 16S-F 16S-R, 45c1 45c2, nheBC1 nheBC2, L1a-F L1a-R, L2a-F L2a-R) ait dizi bilgileri, *B. cereus* için beklenen bant büyüklükleri (bç) ve hedef gen bölgeleri Çizelge 3-1'de verilmiştir.

Çizelge 3-1 Çalışmada kullanılan primerlere ait dizi bilgileri ve beklenen bant büyüklükleri

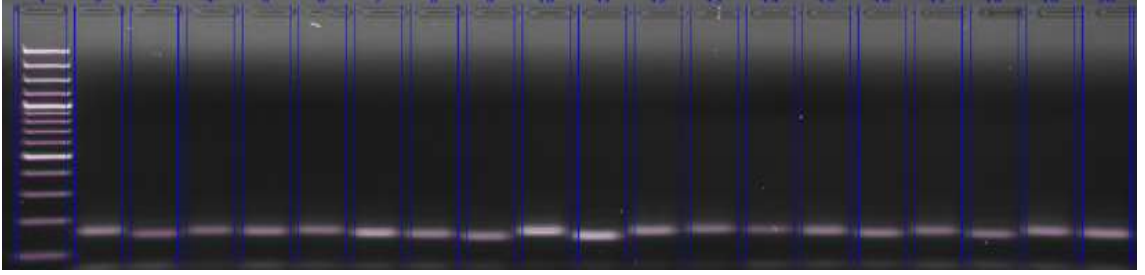
Primer Adı	Primer Dizisi (5'--- 3')	<i>B. cereus</i> 'da Beklenen Bant Büyüklüğü (bp)	Hedef Bölge	Kaynak Makale
IAC-F IAC-R	GCAGCCACTGGTAACAGGAT GCAGAGCGCAGATACCAAAT	118	<i>IAC</i>	Fricker ve ark., 2007
P-F P-R	CCTACGGGAGGCAGCATGC CGTTTACGGCGTGGACTAC	475	<i>IAC</i>	Chiang ve ark., 2006
16S-F 16S-R	GCGGCGTGCCTAATACTGC CTCAGGTCGGCTACGCATCG	267	16S rRNA	De Clerck ve ark., 2004
45c1 45c2	GAGGGGCAAACAGAAGTGAA TGCGAACTTTTGATGATTTCG	186	<i>nheA</i>	Moravek ve ark., 2004
<i>nheBC1</i> <i>nheBC2</i>	ACATTGCGAAAGATAGCTGGA TGTTCTGCTGCAAAAGGATG	300	<i>nheB</i> / <i>nheC</i>	Dietrich ve ark., 2005
L1a-F L1a-R	AGGTCAACAGGCAACGATTC CGAGAGTCCACCAACAACAG	205	<i>hblD</i>	Moravek ve ark., 2004
L2a-F L2a-R	CGAAAATTAGGTGCGCAATC TAATATGCCTTGCGCAGTTG	411	<i>hblC</i>	Moravek ve ark., 2004

PCR reaksiyonları her bir primer için kaynak makalelerinde belirtilen şartlar optimize edilerek yapılmıştır (Çizelge 3-2). PCR'lerde pozitif kontrol (PK) olarak *B. cereus* olduğu kesin olarak bilinen örnek kullanılmıştır.

Çizelge 3-2 Çalışmada kullanılan primerlere ait PCR koşulları

Primer Adı	PCR Döngüsü	PCR Mix (1x)
IAC-F IAC-R	94°C 10 dk 95°C 1 dk 54,9°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 10 dk 30 döngü	5 µL 10X <i>Taq</i> Buffer with KCL 4 µL MgCl ₂ 4 µL dNTP 1 µL Primer F 1 µL Primer R 0.5 µL <i>Taq</i> 12.5 µL ddH ₂ O 4 µL DNA
P-F P-R	94°C 10 dk 95°C 1 dk 51°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 10 dk 30 döngü	5 µL 10X <i>Taq</i> Buffer with KCL 4 µL MgCl ₂ 4 µL dNTP 1 µL Primer F 1 µL Primer R 0.5 µL <i>Taq</i> 1,5 µL ddH ₂ O 4 µL DNA
16S-F 16S-R	94°C 10 dk 95°C 1 dk 60,4°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 10 dk 30 döngü	5 µL 10X <i>Taq</i> Buffer with KCL 4 µL MgCl ₂ 4 µL dNTP 1 µL Primer F 1 µL Primer R 0.5 µL <i>Taq</i> 12.5 µL ddH ₂ O 4 µL DNA
45c1 45c2	94°C 5 dk 94°C 1 dk 50°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 10 dk 30 döngü	2.5 µL 10X <i>Taq</i> Buffer with KCL 2 µL MgCl ₂ 1 µL dNTP 1.5 µL Primer F 1.5 µL Primer R 0.2 µL <i>Taq</i> 14.3 µL ddH ₂ O 2 µL DNA
nheBC1 nheBC2	94°C 5 dk 94°C 1 dk 52°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 10 dk 30 döngü	2.5 µL 10X <i>Taq</i> Buffer with KCL 2 µL MgCl ₂ 1 µL dNTP 1.5 µL Primer F 1.5 µL Primer R 0.2 µL <i>Taq</i> 14.3 µL ddH ₂ O 2 µL DNA
L1a-F L1a-R L2a-F L2a-R	94°C 5 dk 94°C 1 dk 50°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 10 dk 30 döngü	2.5 µL 10X <i>Taq</i> Buffer with KCL 2 µL MgCl ₂ 1 µL dNTP 1.5 µL Primer F 1.5 µL Primer R 0.2 µL <i>Taq</i> 14.3 µL ddH ₂ O 2 µL DNA

Jel imaj sisteminde görüntülenen jellere ait fotoğraflar Biorad ChemiDoc MP programında açıldıktan sonra kuyucuklar (lane) işaretlenmiştir (Şekil 3-5). Ladder'ın baz çifti (bç) bakımından bant büyüklükleri ve bulunduğu kuyucuk numarası girilmiştir. Çalışmada 50 bç Ladder (Thermo Scientific, SM0321) kullanılmıştır.



Şekil 3-5 Bant büyüklükleri ve kuyucukları işaretlenmiş jel fotoğrafı

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada süt örneklerinden alınan DNA örneklerinde *Bacillus cereus*' a özgü tür teşhisi yapılması amacıyla IAC, 16S rRNA, *nheA*, *nheB/nheC*, *hblC* ve *hblD* gen bölgelerine spesifik primerlerle moleküler taramalar yapılmıştır. Bu amaçla farklı toksin genlerine özgü 7 adet (IAC-F IAC-R, P-F P-R, 16S-F 16S-R, 45c1 45c2, *nheBC1* *nheBC2*, L1a-F L1a-R, L2a-F L2a-R) primer kullanılarak toplanan 13 adet süt örneğinde *Bacillus cereus* taraması yapılmıştır. Tüm primerler için jele 50 bç ladder (L), pozitif kontrol (PK) ve sırasıyla 1-13 numaralı örnekler yüklenmiştir. Bu tez çalışmasında incelenen süt örneklerinden çiğ süt numuneleri, 1-11 pastörize sütlerden alınan örnekler ise 12 ve 13 olarak numaralandırılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerle yapılan moleküler taramalara ait jel görüntüleri Şekil 4-1- 4-7'de verilmiştir.

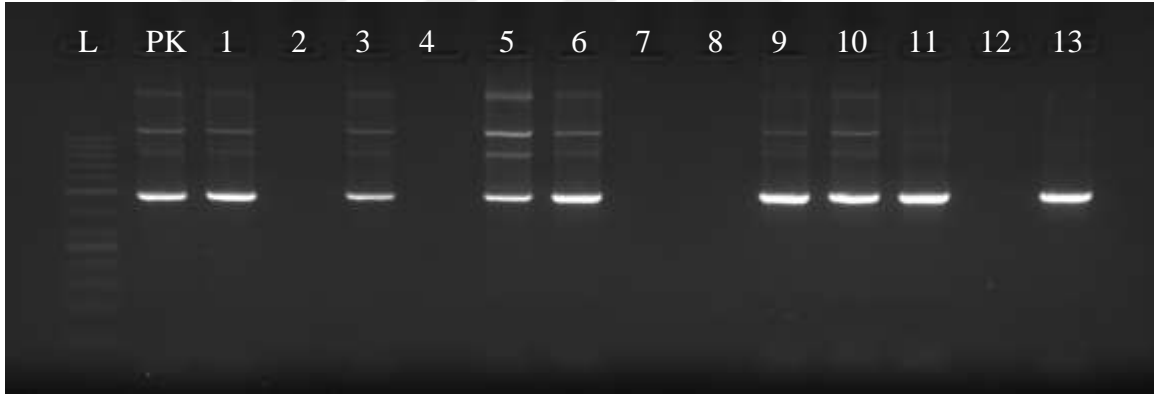
IAC-F IAC-R primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda 13 adet örnekten 01, 03, 05, 06, 09, 10, 11 ve 13 numaralı örneklerin *Bacillus cereus* olduğu saptanmıştır (Şekil 4-1). Bu primere göre toplam 13 adet örnekten 8 tanesinin *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. Fricker ve ark. (2007)' nda belirttiği gibi IAC-F IAC-R primer seti *B. cereus* için yaklaşık 118 bç'de bant vermiştir.



Şekil 4-1 IAC-F IAC-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon (L: 50 bç, PK: Pozitif Kontrol)

Fricker ve ark. (2007) çiğ sütlerde *B. cereus* bakterisinin tür tespiti amacıyla (IAC) gen bölgesine spesifik IAC-F IAC-R primer setini kullanarak başarılı bir şekilde tür tespiti yaptıklarını belirtmişlerdir. Primerlerle moleküler karakterizasyon yapılırken *B. cereus* bakterisinde bulunan IAC gen bölgesine özgü 118 bp büyüklüğünde bantlar elde ettiklerini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da *B. cereus* içeren süt örneklerinde 118 bp boyutunda bantlar gözlenmiştir (Şekil 4-1).

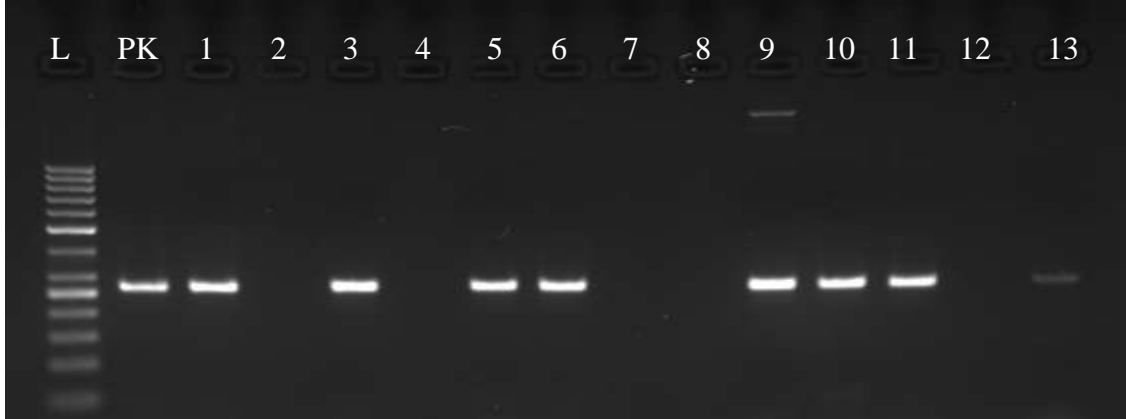
P-F P-R primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda 13 adet örnekten 01, 03, 05, 06, 09, 10, 11 ve 13 numaralı örneklerin *Bacillus cereus* olduğu saptanmıştır (Şekil 4-2). Bu primere göre toplam 13 adet örnekten 8 tanesinin *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. Chiang ve ark. (2006)'nda belirttiği gibi P-F P-R primer seti ile yapılan taramalarda *B. cereus* için beklenen büyüklükte yaklaşık 475 bp'de bant elde edilmiştir.



Şekil 4-2 P-F P-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon (L: 50 bp, PK: Pozitif Kontrol)

Chiang ve ark. (2006) çiğ sütlerde *B. cereus* bakterisinin tür tespiti amacıyla (IAC) gen bölgesine spesifik P-F P-R primer setini kullanarak tür tespitini başarılı bir şekilde sonuçlandırdıklarını belirtmişlerdir. Moleküler taramalarda P-F P-R primeri ile *B. cereus* bakterisinde bulunan IAC gen bölgesine özgü 475 bp büyüklüğünde bantlar elde ettiklerini ifade etmişlerdir. Bu tez çalışmasında incelenen 13 adet süt örneğinde *B. cereus* bakterisine ait moleküler taramalar güvenli şekilde teyit edilmiştir (Şekil 4-2).

16S-F 16S-R primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda 13 adet örnekten 01, 03, 05, 06, 09, 10, 11 ve 13 numaralı örneklerin *Bacillus cereus* olduğu saptanmıştır (Şekil 4-3). Bu primere göre toplam 13 adet örnekten 8 tanesinin *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. De Clerck ve ark. (2004)' nda belirttiği gibi 16S-F 16S-R primer seti ile *B. cereus* için yaklaşık 267 bç'de bant elde edilmiştir.



Şekil 4-3 16S-F 16S-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon (L: 50 bç, PK: Pozitif Kontrol)

De clerck ve ark. (2004), jelatin ve pastörize sütün izole ettikleri *B. cereus*' un 16S rRNA gen bölgesine özgü geliştirdikleri primerin moleküler yöntemlerle bu türe özgü 267 bç boyutunda bant verdiğini ispatlamışlardır. Bu tez çalışmasında da 16S-F 16S-R primerleri kullanılarak 13 adet süt örneği ile yapılan moleküler çalışma ile *B. cereus* için 267 bç boyutunda bant elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4-3).

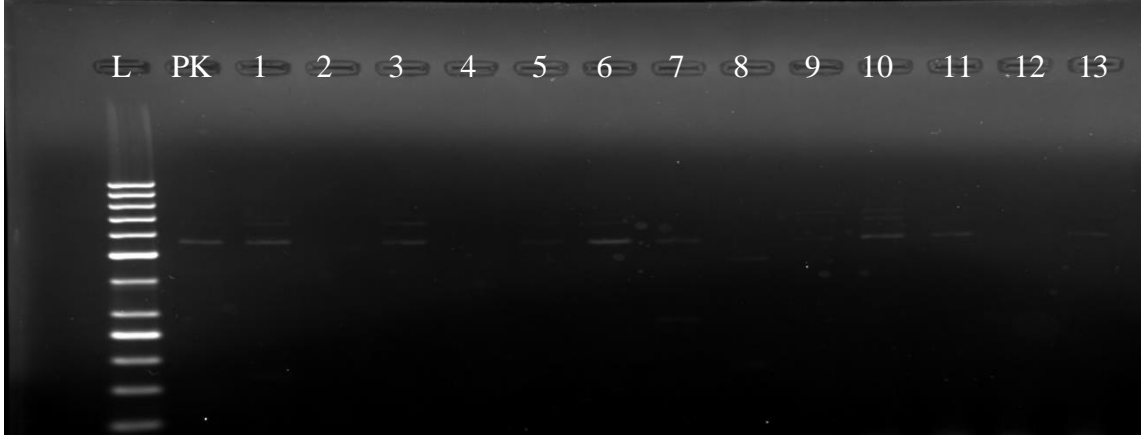
45c1 45c2 primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda 13 adet örnekten 01, 03, 05, 06, 09, 10, 11 ve 13 numaralı örneklerin *Bacillus cereus* olduğu saptanmıştır (Şekil 4-4). Bu primere göre toplam 13 adet örnekten 8 tanesinin *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. Moravek ve ark. (2004)'nda belirttiği gibi 45c1 45c2 primer seti ile yapılan PCR taramalarında yaklaşık 186 bç'de bant elde edilmiştir.



Şekil 4-4 45c1 45c2 primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon (L: 50 bç, PK: Pozitif Kontrol)

Yapılan farklı bir çalışmada Moravek ve ark. (2004) *B. cereus*' un isal tipi gıda zehirlenmelerinden yola çıkarak bebek mamasından izole edilen örneklerin PCR amplifikasyonları ile *B. cereus*' un 45c1 45c2 primerlerinin (nheA) gen bölgesine spesifik çalışmalarında 186 bç boyutunda bant verdiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada incelenen 13 süt örneğinde 45c1 45c2 primerlerinin kullanıldığı taramalarda, *B. cereus* içeren örneklerin beklenen bant büyüklüğü 186 bç boyutunda bant vermesiyle teyit edilmiştir (Şekil 4-4).

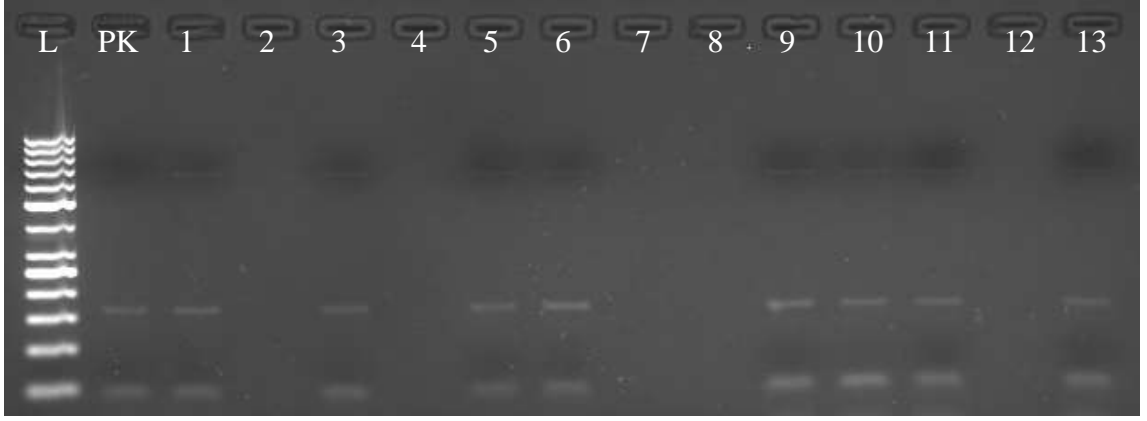
nheBC1 nheBC2 primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda 13 adet örnekten 01, 03, 05, 06, 09, 10, 11 ve 13 numaralı örneklerin *Bacillus cereus* olduğu saptanmıştır (Şekil 4-5). Bu primere göre toplam 13 adet örnekten 8 tanesinin *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. Örnekler kaynak makalelerde de belirtildiği gibi nheBC1 nheBC2 primer seti için yaklaşık 300 bç'de bant vermiştir (Dietrich ve ark., 2005).



Şekil 4-5 nheBC1 nheBC2 primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon (L: 50 bç, PK: Pozitif Kontrol)

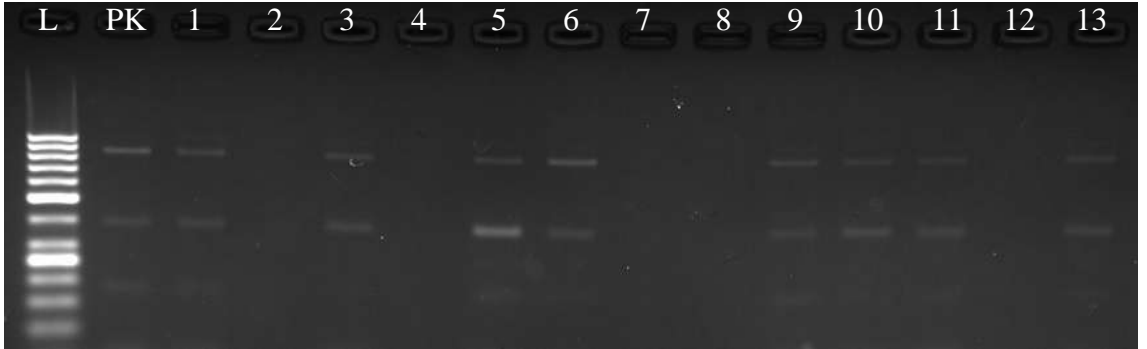
Bir diğer çalışmada Dierick ve ark. (2005) *B. cereus*' un tespit edilmesi amacıyla toplam 50 farklı suşu nheBC1 nheBC2 primerleri ile nheB/nheC gen bölgelerine spesifik PCR yöntemi ile taramışlardır. Çalışma sonucunda 300 bç boyutunda bant gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında da aynı şekilde (nheB/nheC) gen bölgesine özgü primerin kullanıldığı moleküler taramalarda beklenen büyüklükte fragman elde edilmiştir.

L2a-F L2a-R primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda 13 adet örnekten 01, 03, 05, 06, 09, 10, 11 ve 13 numaralı örneklerin *Bacillus cereus* olduğu saptanmıştır (Şekil 4-6). Türe özgü primer ile yapılan PCR taramaları sonucunda toplam 13 örnekten 8 tanesinin *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. Örnekler kaynak makalelerde de belirtildiği gibi L2a-F L2a-R primer seti için yaklaşık üç farklı büyüklükte bant vermiştir (Zhang ve ark., 2016).



Şekil 4-6 L2a-F L2a-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon (L: 50 bç, PK: Pozitif Kontrol)

L1a-F L1a-R primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda 13 adet örnekten 01, 03, 05, 06, 09, 10, 11 ve 13 numaralı örneklerin *Bacillus cereus* olduğu saptanmıştır (Şekil 4-7). Bu primere ile yapılan moleküler taramalarda incelenen süt örneklerinin 8 tanesinin *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. Örnekler kaynak makalelerde de belirtildiği gibi L1a-f L1a-R primer seti için yaklaşık üç farklı büyüklükte bant vermiştir (Zhang ve ark., 2016).



Şekil 4-7 L1a-F L1a-R primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon (L: 50 bç, PK: Pozitif Kontrol)

Moravek ve ark. (2004), *B. cereus*' un ishal tipi gıda zehirlenmelerinden yola çıkarak bebek mamasında hb1D gen bölgesine spesifik L1a-F L1a-R primerlerini kullanarak yaptıkları moleküler çalışmada, bu primerin *B. cereus*'un moleküler tespitinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da L1a-F L1a-R primerleri ile 13 süt örneğinde *B. cereus* varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4-7).

Zhang ve ark. (2016) gıda kaynaklı hastalıkların çeşitli toksin salgınlarından sorumlu olan *Bacillus cereus* 'un, süt tozu, erişte ve pirinçte enterotoksin üreten canlı hücrelerini seçici olarak tespit etmek ve 62 suşta enterotoksinlerin dağılımını araştırmak için multipleks PCR' yi kullanmışlardır. *B. cereus*' a ait enterotoksin (*cytK*, *nheA* ve *hblD*) genlerine spesifik primerlerin özgüllüğü tek bir PCR kullanılarak doğrulanmıştır. Multipleks PCR koşullarının optimizasyonu üzerine, canlı hücrelerin tespit sınırının saf kültürde 102 kob/g *B. cereus* olduğu bulunmuştur. Ayrıca tespit için multipleks PCR' ye dayanan protokol *B. cereus*' un toksin geninin tespiti için uygulanmış ve sonuçlar toksin genine dayalı primerlerden *B. cereus*' un tür teşhisinde faydalı sonuçlar alındığını belirtmişlerdir.

Yang ve ark. 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada beş farklı enterotoksin ve bir emetik *Bacillus cereus* toksini karakterize etmişlerdir. *B. cereus* grubundaki türlerin tüm enterotoksini ve emetik spesifik dizilerini çoğaltmak için 12 primer çiftli ile PCR taramaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen primerlerle yapılan tarama testleri, 162 gıda zehirlenmesi ve gıda ile ilgili suşların toksijenik potansiyelini analiz etmek için başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar, tüm test suşları için 10 toksijenik patern olduğunu göstermiştir. *B. cereus* suşlarının tümü en az bir toksin geni taşımıştır. Ayrıca iki tür yakından ilişkili olmasına rağmen, *B. mycooides* suşlarının toksin profilleri ve toksin genleri *B. cereus*' tan önemli ölçüde farklı çıkmıştır ($P < 0.05$). Çalışma sonucunda, *B. cereus* grubundaki türlerin moleküler tespiti ile birlikte toksin genlerinin saptanmasının önemi de belirtilmiştir.

Bir diğer çalışmada ise Ngamwongsatit ve ark. (2008) 8 toksin genine (*hblC*, *hblD*, *hblA*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK* ve *entFM*) spesifik 8 yeni PCR primeri çifti tasarlamış ve bu primerleri kullanarak 411 adet *B. cereus* suşlarında (121 gıda ve 290 toprak izolatu) ve 205 adet *B. thuringiensis* suşlarında (43 serovar, 10 gıda ve 152 toprak izolat) moleküler taramalar yapmışlardır. Bu sekiz toksin geninin varlığına göre, toplam 616 izolat dört gruba ayrılmıştır. Grup I'de sekiz genin hepsi aynı anda 403 (% 65.42) izolatta meydana gelirken, Grup II (134 izolat veya % 21.75) ve Grup III (46 izolat veya % 7.47)'ün sırasıyla *hblCDA* ve *cytK* içermediği tespit edilmiştir. Grup IV'te hem *hblCDA* hem de *cytK* genini içermeyen 33 izolat saptanmıştır. *B. thuringiensis* suşlarında (% 86.80) *hblCDA* varlığı, *B. cereus* suşlarına (% 66.18) göre anlamlı olarak

daha yüksek (Pb0.05) iken, her iki bakteri grubu arasında *nheABC*, *cytK* ve *entFM* oluşumu açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. Hem *nheABC* hem de *entFM* genleri tüm *B. cereus* ve *B. thuringiensis* suşlarında (toplam 616 suş) bulunurken, *cytK* geni *B. cereus*'un 365' inde (% 88.80) ve *B. thuringiensis* suşlarının ise 172' sinde (% 83.90) saptanmıştır. Test edilen 616 suşun hiçbiri *hbl* geninin varlığını göstermemiştir. Geliştirilen sekiz primer çifti, yüksek duyarlılığa sahip hücrelerden sekiz toksin geninin hızlı bir şekilde saptanmasında kullanılmış, % 100 tekrarlanabilirlik sağlamış ve diğer 32 bakteri suşuna çapraz reaksiyon vermediği test edilmiştir.

Bir başka çalışmada Ogawa ve ark. (2015) şarbon hastalığına neden olan *B. anthracis*'i tespit etmek için hızlı ve hassas bir yöntemin geliştirilmesinin, hayvan vakalarında halk sağlığı sorunlarına yönelik şarbon risk yönetimi ve kontrolü için oldukça önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, son zamanlarda şiddetli ekstra bağırsak enfeksiyonuna ve ayrıca insan patojeniği *B. thuringiensis*'e neden olan *B. cereus*' un ortaya çıkması nedeniyle *B. anthracis*'i daha önce bildirilmiş moleküler tabanlı yöntemler kullanarak tanımlamak zorlaşmıştır. Kromozomal arka planların yakın genetik ilişkisi, moleküler tabanlı tanının karmaşıklığına yol açmıştır. Ogawa ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada, *B. anthracis* virülans plazmitlerinin varlığını tarayabilen ve *B. anthracis* ve genetik olarak ilgili suşları diğer *B. cereus* grubu türlerinden ayırt edebilen multipleks PCR' yi geliştirmişlerdir. *B. anthracis* ve benzeri suşların bir kromozomunu hedefleyen altı primer setini, iki virülans plazmidi (pXO1 ve pXO2), bir bakteri geni (16S rRNA geni) ve bir memeli genini (aktin-beta geni) tarayacak şekilde tasarlamışlardır. Geliştirilen primerlerin ve tasarlanan multipleks PCR'nin *B. anthracis*'e duyarlı olduğunu, ayrıca kontrol primerlerinin incelenen tüm bakteriyel ve memeli DNA'larını saptadığını bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda geliştirilen primerlerin moleküler taramalarda kullanılması ile yapılan amplifikasyon testinin pratik ve hızlı bir şekilde uygulanabilirliğini göstermişlerdir. Bu primerler ayrıca Japonya'daki hastane enfeksiyonları salgınlarından izole edilen *B. cereus* suşları ve *B. anthracis* ile genetik olarak ilgili klinik suşların tespiti için uygulanmış, *B. cereus* grubu suşların olduğunu belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, yeni geliştirilen multipleks PCR' nin ve primerlerin *B. cereus* ve *B. anthracis* saptamak için hassas ve pratik bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir.

Ehling-Schulz ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışmada, elde ettikleri PCR fragmanın *B. cereus*' un emetik toksini üreten suşlarına özgü olduğunu göstermişlerdir. Bu ampikonun dizisi belirlenmiş ve bu temelde bir PCR analizi geliştirilmiştir. Farklı gıda zehirlenmesi salgınlarından elde edilen 100 adet *B. cereus* izolatu ile farklı coğrafi bölgelerden çeşitli gıda kaynakları ve *B. cereus* grubuna ait diğer türlerden 29 suşun testi yapılmıştır. Testin emetik toksin üreten *B. cereus* suşlarına özgü olduğunu göstermek için testin gıda patojenlerine özel vurgu yapan 49 *B. cereus* suşu kullanılmıştır. Yapılan PCR taramaları ile emetik toksin üreten *B. cereus* suşlarının hızlı tespiti için moleküler test geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında da *Bacillus cereus* bakterisine farklı toksin gen bölgelerine (*IAC*, *16S rRNA*, *nheA*, *nheB/nheC*, *hblC* ve *hblD*) özgü spesifik primerler (*IAC-F IAC-R*, *P-F P-R*, *16S-F 16S-R*, *45c1 45c2*, *nheBC1 nheBC2*, *L1a-F L1a-R*, *L2a-F L2a-R*) kullanılarak moleküler taramalar yapılmıştır. Kullanılan primerlerin *B. cereus*' un moleküler tür teşhisi için başarılı bir şekilde kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

5. SONUÇ

İnsan beslenmesinde en önemli temel gıda maddelerinden olan sütün hijyenik koşullar sağlanmadan üretilmesi, saklanması, işlenmesi ve gerekli kontrollerin yapılmaması durumunda insan sağlığına zararlı maddeler oluşmaktadır. *Bacillus cereus* doğada yaygın olarak bulunan ve gıda zehirlenmesine neden olan patojen bir bakteridir. Son yıllarda özellikle *B. cereus* ile kontamine olan süt ve süt ürünlerinin insan sağlığına olumsuz etkileri olduğu, süt ve süt ürünlerinin muhafazası sırasında toksin maddeler oluşturdukları bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında çiğ süt ve pastörize süt örneklerinde gıda zehirlenmesi ve kalite kaybı gibi olumsuz etkilere neden olan *Bacillus cereus* bakterisine ait gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile moleküler düzeyde tür tespiti yapılmıştır. *Bacillus cereus* bakterisine ait 6 adet toksin gen bölgesine (*IAC*, *16S rRNA*, *nheA*, *nheB/nheC*, *hblC* ve *hblD*) özgü 7 adet spesifik primer (*IAC-F IAC-R*, *P-F P-R*, *16S-F 16S-R*, *45c1 45c2*, *nheBC1 nheBC2*, *L1a-F L1a-R*, *L2a-F L2a-R*) kullanılarak moleküler taramalar yapılmıştır. Çalışmada 13 adet süt örneğinden 8 adedinde yapılan moleküler taramalara göre *B. cereus*' a spesifik büyüklükte bant profilleri saptanmış, 7'sinde ise bu gen bölgelerine rastlanmamıştır. Çalışma sonucunda incelenen 13 adet süt örneğinden 8 tanesinde *Bacillus cereus* bakterisi moleküler olarak tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında moleküler tür tespitinde kullanılan primerlerin, süt ve süt ürünlerinde *B. cereus* tespitine yönelik çalışmalarda kullanılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Türkiye'de sütte mikroorganizma tayini çoğunlukla mikrobiyolojik özelliklere göre yapılmaktadır, ancak morfolojik olarak yapılan tür tespitleri her zaman doğru sonuç vermemektedir. Sütte gıda zehirlenmesi ve kalite kaybı gibi olumsuz etkilere neden olan *B. cereus* bakterisinin moleküler tür teşhisinin yapılması büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda bu tez çalışmasında da *B. cereus* bakterisi moleküler olarak tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında *B. cereus* bakterisinin belirli gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi ile hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. Süt gibi temel gıda maddelerinde bu tür moleküler çalışmaların arttırılmasının gıda güvenliği açısından daha iyi sonuçlara ulaşılması bakımından oldukça önemli olduğu ifade edilebilir. Birçok bakteri tabanlı tespit çalışmalarında izolasyon ve identifikasyonun klasik mikrobiyoloji ve biyokimyasal yöntemlerle yapılması yoğun iş gücü, deneyimli personel, özel araç ve gereçler gerektirmektedir. Bu sebeplerden dolayı mikrobiyolojik olarak gıdalardan bakteri izolasyonu ve identifikasyonu gibi çalışmalarda daha spesifik, duyarlı, güvenilir ve hızlı yapılabilen moleküler testlerin geliştirilmesi ve yaygınlaştırılması gerekmektedir.

Son yıllarda en sık kullanılan moleküler yöntemlerin başında hızlı ve güvenilir sonuç veren PCR ile moleküler tür teşhisi gelmektedir. Bu yöntemin kullanılmasının yaygınlaştırılması ile gıdalarda mikrobiyolojik olarak ölümcül ve insan sağlığına olumsuz etkide bulunan bakterilerin hızlı ve zamanında teşhisi oldukça önemlidir. Temel gıda maddelerinde bu tür çalışmaların desteklenmesi ve geliştirilmesi gelecekte yaşanması muhtemel sağlık problemlerinin önlenmesinde ve kısa zamanda teşhis yöntemiyle tedaviyi hızlandırmada fayda sağlayacaktır. Bu bağlamda bu tez çalışması ile elde edilen sonuç ve kullanılan yöntemlerin de süt ve süt ürünlerinde *B. cereus* bakterisinin tespitine yönelik ileride yapılacak çalışmalarda yararlı olacağı öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A., İnan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Güllüce, M., Beldüz, A.O. ve Barış, Ö., 2011. Pasinler Kaplıcasından İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Farklılıkları. *Turkish Journal of Biology*, 35, 267-274.
- Ahmed, D.A.H., Moustafa, M.F. ve Marth, E.H., 1983. Incidence of *Bacillus cereus* in Milk and Some Milk Products. *Journal of Food Protection*, 46, 126-128.
- Alişarlı, M., Solmaz, H. ve Akkaya, L., 2003. Süt İneklerinde Meme Başı Derilerinin Bazı Mikroorganizmalar ve Çiğ Sütlerinde Mikrobiyolojik Kalite Yönünden İncelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14(1), 35-39.
- Andersson, M.A., Jääskeläinen, E.L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L.M. ve Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Sperm Bioassay for Rapid Detection of Cereulide-Producing *Bacillus cereus* in Food and Related Environments. *International Journal of Food Microbiology*, 94(2), 175-83.
- Ankolekar, C., Rahmati, T. ve 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.
- Anonim, 2000. Çiğ süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. 14.02.2000-23964 nolu Resmi Gazete. 2000/6 Nolu Tebliğ.
- Aragon-Alegro, L.C., Palcich, G., Volz Lopes, G., Ribeiro, V.B. ve Destro, M.T., 2008. Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. *Journal of Food Protection*, 71(10), 2115-2118.
- Banykó, J. ve Vyletelova, M., 2009. Determining the Source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* Isolated from Raw Milk, Pasteurized Milk and Yoghurt. *Letters in Applied Microbiology*, 48 (3), 318-23.
- Batchoun, R., Al-Sha'er, A.I. ve 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.
- Bilgehan, H., 2005. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Barış Yayınları. Fakülteler Kitabevi, Bornova-İzmir.
- Burdova, O., Baranova, M., Laukova, A., Rozanska, H. ve Rola, J.G., 2002. Hygiene of Pasteurized Milk Depending on Psytrophic Microorganisms. *Journal of Veterinary Research*, 46, 325-329.

- Hansen, B.M. ve Hendriksen, N.B., 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 185-189.
- Chavez J.Q., Pires, E.S. ve Vivoni, A.M., 2011. Genetic Diversity, Antimicrobial Resistance and Toxigenic Profiles of *Bacillus cereus* Isolated from Food in Brazil Over Three Decades. *International Journal of Food Microbiology*,147(1), 12-16.
- Chiang, Y.C., Yang, C.Y., Li, C., Ho, Y.C., Lin, C.K. ve Tsen, H.Y., 2006. Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S Ribosomal DNA-Based Oligonucleotide Array Hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 131-137.
- Choo, E., Jang, S.S., Kim, K., Lee, K.G., Heu, S. ve Ryu, S., 2007. Prevalence and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* in Dried Red Pepper in Korea. *Journal of Food Protection*, 70, 917-922.
- Corona, A., Fois, M.P., Mazzette, R. ve De Santis, E.P., 2003. A New Multiplex PCR for The Detection of hbl Genes in Strains of The '*Bacillus cereus* Group'. *Vet Res Commun. Suppl*, 1, 679-682.
- Çadırcı, Ö., Gücükoğlu, A., Terzi, G., Kevenk, T.O. ve Mlişarlı, M., 2013. Determination of Enterotoxigenic Gene Profiles of *Bacillus cereus* Strains Isolated from Dairy Desserts by Multiplex PCR. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(5), 869-874.
- Coşkun, M., Akyüz, N. ve Bakırcı, İ., 1990. Süt ve Mamullerinin Toplumun Beslenmesindeki Yeri ve Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1(1), 166-173, Van.
- Coşkun, M., 1995. Farklı Metotlarla Üretilen Otlu Peynirlerde Olgunlaşma Süresi Boyunca Meydana Gelen Değişmeler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Van.
- Çöl, B.G., 2014. Çeşitli Gıdalarda *Bacillus cereus* Toksinlerinin Varlığı ve Tiplendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.
- De Clerck, E., Van Mol, K., Jannes, G., Rossau, R. ve De Vos, P., 2004. Design of a 50 Exonuclease-Based Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Bacillus licheniformis*, Members of the *B. cereus* Group and *B. fumarioli* in Gelatine. *Letters in Applied Microbiology*, 39(1), 109-115.
- Dierick, K., Van, C.E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A. ve Hoedemaekers, G., 2005. Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus* Associated Food Poisoning. *Journal Clinical Microbiology*, 43, 4277-4279.

- Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Märtlbauer, E. ve Scherer, S., 2005. Identification and Partial Characterization of the Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Responsible for Cereulide Production in Emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 105-113.
- Faille, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelievre, C. ve Slomianny, C., 2007. Occurrence of *Bacillus cereus* Spores With a Damaged Exosporium: Consequences on the Spore Adhesion on Surfaces of Food Processing Lines. *Journal Food Protection*, 70, 2346-2353.
- Fricker, M., Messelhäusser, U., Busch, U., Scherer, S. ve Ehling-Schulz, M., 2007. Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1892-1898.
- Güven, M. 1993. İnek, Koyun ve Keçi Sütlerinden Üretilen ve Farklı Materyallerde Olgunlaştırılan Tulum Peynirlerinin Özellikleri Üzerinde Karşılaştırmalı Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana.
- Granum, P.E., 1994. *Bacillus cereus* and Its Toxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 61-66.
- Hansen, M.B., Leser, D.T. ve Hendriksen, N.B., 2001. Polymerase Chain Reaction Assay For The Detection of *Bacillus cereus* Group Cells. *FEMS Microbiology Letters*, 202, 209-213.
- Hsieh, Y.M., Sheu, S.J., Chen, Y.L. ve Tsen H.Y., 1999. Enterotoxigenic Profiles and Polymerase Chain Reaction Detection of *Bacillus cereus* Group Cells and *B. cereus* Strains From Foods And Foodborne Outbreaks. *J. Appl. Microbiol.*, 87, 481-490.
- Hsieh, Y.M., Sheu, S.J., Chen, Y.L. ve Tseni, H.Y., 2000. *Bacillus cereus* Group Strains, Their Hemolysin BL Activity, and Their Detection in Foods Using a 16S RNA and Hemolysin BL Gene-Targeted Multiplex Polymerase Chain Reaction System. *Journal. Appl. Microbiology*, 63(11), 1496-502.
- Kalkan, S. ve Halkman, K., 2006. *Bacillus cereus* 'un İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 04(01), 1-11.
- Kahya S., Buyukcangaz E., Carlı K.T., 2013. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 32 1: 31-38
- Kılıç, S., 2010. Süt Mikrobiyolojisi, Ege Üniversitesi Sidas Yayıncılık, 1-3 s., İzmir.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö., 2011. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonunda/ Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Erciyes Ün. Fen Bil. Enst. Derg.*, 27(1), 62-74.
- Koluman, A., 2010. Piliç Kümesleri ve Kesimhanelerinde *Campylobacter jejuni* Kontaminasyonu Belirlenmesi. *Türk Hijyen Den. Biyo. Derg.*, 67(2), 57-64.

- Küçüköner, E. ve Tarakçı, Z. 1998. Van ve Yöresinde Üretilen Cacığın (Otlı Çökelek) Bazı Özelliklerinin Araştırılması. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Geleneksel Süt Ürünleri, Milli Produktivite Yayınları: 621, 175-184 s., Ankara.
- Malek, F., Boudjemaa, B., Métri, A.A. ve Kihal. M., 2013. Identification and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* Strains Isolated from a Pasteurized Milk Processing Line in Algeria. *Dairy Science & Technology, EDP Sciences/Springer*, 93 (1),73-82.
- Mantynen V. ve Lindström K., 1998. Arapit PCR-Based DNA Test for Enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiology*, 65(5),1634-1639.
- Manzano, M., Guisto, C., Medrala, D., Cantoni, C. ve Comi, G., 2003. Optimization of DNA Extraction to Detect *Bacillus cereus* From Food Using A PCR Technique - Short Communication. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 12(53), 69-71.
- McSweeney, P.L.H. ve Fox, P.F. ,2008. Advanced Dairy Chemistry: Volume 3-Lactose, Water, Salts and Minor Components, 3rd. Edition, Springer Publishers, New York.
- Moter, A. ve Gobel, U.B., 2000. Fluorescence Insitu Hybridization (FISH) for Direct Visualization of Microorganisms. *J Microbiol Methods*, 41(2), 85-112.
- Moravek, M., Wegscheider, M., Schulz, A., Dietrich, R., Bürk, C. ve Märtlbauer, E., 2004. Colony Immunoblot Assay for the Detection of Hemolysin BL Enterotoxin Producing *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 238, 107-113.
- 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.
- Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikam, C., Ohba, M., Assavanig, A. ve Panbangred, W., 2008. Broad Distribution of Enterotoxin Genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) Among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as Shown by Novel Primers. *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 352-356.
- Nilsson, J., Svensson, B., Ekelund, K. ve Christiansson, A., 1998. A RAPD-PCR Method for Large-Scale Typing of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*. 27, 168-172.
- Oktay, H.İ. ve Heperkan, D., 2010. *Aspergillus* İzolatlarının PCR İle Tanısı, Bazı Mikotoksinlerin in Vitro Tayini, Sıcaklık ve Sürenin İncirde Aflatoksin ve Siklopiazonik Asit Oluşumuna Etkisi. Doktora Tezi İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Okahisa, N., Inatsu, Y., Juneja, V.K. ve Kawamoto, S., 2008. Evaluation and Control of the Risk of Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria Present in Awa-Uirou, a Sticky Rice Cake Containing Sweet Red Bean paste. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(3), 351-359.

- Ogawa, H., Fujikura, D., Ohnuma, M., Ohnishi, N., Hang'ombe, B.M. ve Mimuro, H., 2015. A Novel Multiplex PCR Discriminates *Bacillus anthracis* and Its Genetically Related Strains from Other *Bacillus cereus* Group Species. *National Institute of Agriculture and Veterinary Research, Portugal*.
- Osmanağaoğlu, Ö., Kıran, F. ve Oral, B., 2010. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rDNA Sekans Analizi ile Tanımlanması. Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi, s. 28, Ankara.
- Özdemir, H., 2003. Pastörize Sütlerde *B. cereus* 'un Varlığı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği, 28(6), 611-614, Ankara.
- Özdil, F. ve Başpınar, E., 2004. Keçi Sütü Somatik Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform ve Chelex 100 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11(1), 16-20.
- Park, H.S., Kim, H.J., Kim T.W. ve Kim, H.Y., 2007. Simultaneous Detection and Identification of *Bacillus cereus* Group Bacteria Using Multiplex PCR. *J. Microbiol. Biotechnol*, 17(7), 1177-1182.
- Sachse, K., 2004. Specificity and Performance of PCR Detection Assays For Microbial Pathogens. *Molecular Biotechnology*, 26, 61-79.
- Saiki, K.R., Gelfand, H.D., Stoffl, Ş., Scharf, J.Ş., Higuchi, R., Horn, T.G., Mullis B. ve Erlich, A.H., 1988. Primer - Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polimerase. *Science*, 239, 487-494.
- Sekin, Y. ve Karagözlü, N. 1997. Gıda Mikrobiyolojisi Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. 4. Basımdan Çeviri. Literatür Yayıncılık. Dağıtım No: 115.
- Smith, D.P., Berrang, M.E., Feldner, P.W., Phillips, R.W. ve Meinersmann, R.J., 2004. Detection of *Bacillus cereus* on Selected Retail Chicken Products. *Journal of Food Protection*, 67, 1770-1773.
- Tayar, M. ve Şen, M.K.C., 2007. Hayvansal Ürünler Teknolojisi. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 60-67 s., Eskişehir.
- Tektemur, A., 2010. Pastörize Sütlerde *Bacillus cereus* Varlığının Tespiti Üzerine Bir Araştırma. Fırat Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ.
- Tutar E, Köksalan E, Akyol İ. Gıdalarda bulunan mikrobiyal patojenlerin karakterizasyonunda Real Time PCR teknolojisi. *KSÜ. Doğa. Bil. Derg.* 2015;18(4):26-39.
- Us, E., Erdem, B., Tekelli, A., Gerçeker, D., Saran, B., Bayramova, M. ve Şahin, F., 2011. *Salmonella* Serotip Enteridis İzolatlarının Plazmid Profil Analizi ve Pulsed Field Jel Elektroforezi İle İncelenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45(2), 210-227.

- Van Netten, P., Van de Moosdijk, A., Van Hoensel, P., Mossel, D.A. ve Perales, I., 1990. Psychrotrophic Strains of *Bacillus cereus* Producing Enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 73-79.
- Wehrle, E., Moravek, M., Dietrich, R., Bürk, C., Didier, A. ve Märtlbauer, E., 2009. Comparison of Multiplex PCR, Enzyme Immunoassay and Cell Culture Methods for the Detection of Enterotoxinogenic *Bacillus cereus*. *Journal of Microbiology*, 78, 265-270.
- Wehrle, E., Didier, A., Moravek, M., Dietrich, R. ve Märtlbauer, E., 2010. Detection of *Bacillus cereus* with Enteropathogenic Potential by Multiplex Real-Time PCR Based on SYBR Green I. *Molecular Cellular Probes*, 24, 124-130.
- WHO, 2008. Foodborne Disease Outbreaks: *Guidelines for investigation and control*. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547222_eng.pdf. (Erişim 20.11.2019).
- Wong, H.C., Chang, M.H. ve Fan, J.Y., 1988. Incidence and Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Contaminating Dairy Products. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(3), 699-702.
- Yang, I.C., Shih, D.Y., Huang, T.P., Huang, Y.P., Wang, J.Y. ve Pan, T.M., 2006. Establishment of a Novel Multiplex PCR Assay and Detection of Toxigenic Strains of the Species in the *Bacillus cereus* Group. *Journal of Food Protection*, 68, 2123-2130.
- Yetilmezler, E., 2010. Sığır Sütünde *Brucella* ve *Listeria* Tanısı için PCR Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Zhang, Z., Feng, L., Xu, H., Liu, C., Shah, N.P. ve Wei, H., 2016. Detection of Viable Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus* and Analysis of Toxigenicity from Ready-to-Eat Foods and Infant Formula Milk Powder by Multiplex PCR. *Journal of Dairy Science*, 99, 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Elif Bozkurt
Doğum Tarihi ve Yeri: 1994/Karaman
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0545 7765877
e-mail : elifgunvar@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmebey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı	2016-2020
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı	2012-2016
Lise	Karaman Lisesi/Fen Bilimleri	2009-2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2018	Karaman Özel Eğitim Meslek Okulu Tarım Bölümü	Tarım Öğretmenliği
2017	Slava Süt ve Süt Ürünleri	Ziraat Mühendisi

Proje Görevi: 16-YL-18 No'lu BAP Yüksek Lisans BAP Projesi, Araştırmacı.