



**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN SPORLU BAKTERİLERİN İZOLASYONU
VE PATOJENİTE KRİTERLERİNİN İNCELENMESİ**

Pınar MEMİŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2019

Pınar MEMİŞ tarafından hazırlanan “SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN SPORLU BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE PATOJENİTE KRİTERLERİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nihal YÜCEL

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

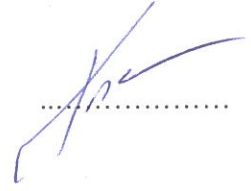
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan: Prof. Dr. Nevin KESKİN

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 12/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Pınar MEMİŞ

12/07/2019

SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN SPORLU BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE PATOJENİTE KRİTERLERİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Pınar MEMİŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Araştırmamızda 06.07.2015-04.05.2017 tarihleri arasında Ankara’da bir süt fabrikasından alınan çiğ süt ile pazar ve market gibi çeşitli yerlerden alınan peynir, dondurma örneklerinde *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi sporlu bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Tanımlanan bu izolatların biyofilm, patojenite ve enzim aktiviteleri incelenmiştir. İncelediğimiz 40 çiğ süt örneğinin 30’unda (%75), 40 peynir örneğinin 31’inde (%77,5) ve 20 dondurma örneğinin 6’sında (%30) *Bacillus* türleri izole edilmiştir. Bu izolatların 36’sı (%53,7) *B. subtilis*, 12’si (%17,9) *B. cereus*, 10’u (%14,9) *B. megaterium*, 6’sı (%9) *B. licheniformis*, 2’si (%3) *B. circulans*, 1’i (%1,5) *B. brevis* olarak tanımlanmıştır. İncelediğimiz aynı örneklerden; 40 çiğ süt örneğinden 1 (%2,5), 40 peynir örneğinden 4 (%10) *Clostridium* türü izole edilmiştir. İzole ettiğimiz 5 *Clostridium* izolatının 2’si (%40) *C. bifementans*, 1’i (%20) *C. sporogenes*, 1’i (%20) *C. sordellii*, 1’i (%20) *C. beijerinckii* olarak bulunmuştur. *Bacillus* izolatları için 24 ve 48 saatlik mikropate ile TSB (Tryptic Soy Broth) ve %1 Glukoz kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasındaki yüksek tutunma gösteren tüm suşlarının hepsinin de *B. subtilis* olduğu dikkat çekmiştir. *Clostridium* izolatları için 24 ve 48 saatlik Reinforced Clostridial Medium kullanarak yapılan biyofilm çalışmasında yüksek derece tutunma gösteren suşun *C. beijerinckii* olduğu gözlemlenmiştir. İzole edilen *Bacillus* türlerinin hemoliz ve DNaz aktiviteleri incelendiğinde; çiğ süt örneklerinin (%80-%66,7), peynir örneklerinin (%83,9-%50), dondurma örneklerinin (%50-%50) pozitif olduğu bulunmuştur. Aynı *Bacillus* izolatlarının proteolitik, lipolitik, lesitinaz enzim aktiviteleri incelendiğinde çiğ süt örneklerinde (%56,7-%46,7-%43,3), peynir örneklerinde (%71-%80,6-%45,2), dondurma örneklerinde (%66,7-%66,7-%33,3) pozitiflik gözlemlenirken; jelatin ve siderefor testlerinde ise çiğ süt örneklerinde (%76,7-%63,3), peynir örneklerinde (%77,4-%64,5), dondurma örneklerinde (%66,7-%50) pozitiflik tespit edilmiştir. Çiğ süt ve dondurmadan izole edilen *Clostridium* izolatlarının hepsinin hemoliz aktivitesi pozitif bulunmuştur. *Clostridium* izolatlarının proteolitik, lipolitik, lesitinaz, enzim aktiviteleri incelendiğinde çiğ süt örneklerinde hepsi negatif bulunurken, peynir örneklerinde ise (%100-%25-%75) pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda izole edilen *Bacillus* türleri penisilin, ampisilin, eritromisin, basitrasin, novobiosin antibiyotiklerine dirençlilik göstermiştir.

Bilim Kodu : 2034
Anahtar Kelimeler : *Bacillus*, *Clostridium*, Çiğ Süt, Peynir, Dondurma, Enzim, Patojenite, Biyofilm
Sayfa Adeti : 137
Danışman : Prof. Dr. Nihal YÜCEL

ISOLATION OF THE SPORE-FORMING BACTERIA FROM MILK AND DAIRY PRODUCTS AND EXAMINATION OF THEIR PATHOGENECITY CRITERIA

(M. Sc. Thesis)

Pınar MEMİŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

In our research, the existence of the *Bacillus* and *Clostridium* type spore-forming bacteria were examined in the samples of the raw milk obtained from a milk factory in Ankara between the dates of 06.07.2015-04.05.2017 and cheese and ice cream obtained from various places such as markets and groceries. The biofilm, pathogenicity, and enzyme activities of these identified isolates were investigated. The *Bacillus* species were isolated in 30 (75%) of the 40 raw milk samples, in 31 (77,5%) of the 40 cheese samples, and in 6 (30%) of the 20 ice cream samples, which we examined. Of these isolates, 36 (53,7%) were identified as *B. subtilis*, 12 (17,9%) as *B. cereus*, 10 (14,9%) as *B. megaterium*, 6 (9%) as *B. licheniformis*, 2 (3%) as *B. circulans*, and 1 (1,5%) as *B. brevis*. From among the same samples we examined; 1 (2,5%) *Clostridium* species from the 40 raw milk samples, and 4 (10%) from the 40 cheese samples were isolated. Of the 5 *Clostridium* isolates, we isolated, 2 (40%) were found as *C. bifermentans*, 1 (20%) as *C. sporogenes*, 1 (20%) as *C. sordellii*, and 1 (20%) as *C. beijerinckii*. It was noted that all strains of the *Bacillus* isolates which showed high attachment in the biofilm study conducted for them by using 24-48 hour microplates 1% TSB (Tryptic Soy Broth) and Glucose were of *B. subtilis* species. It was observed that the strain showing common high attachment in the biofilm study conducted for the *Clostridium* isolates by using 24-48 hours Reinforced Clostridial Medium was of the species of *C. beijerinckii*. When the hemolysis and DNase activities of the isolated *Bacillus* species were examined, it was found that (80%-66,7%) of the raw milk samples, (83,9%-50%) of the cheese samples, and (50%-50%) of the ice cream samples were positive. When the proteolytic, lipolytic, and lecithinase enzyme activities of the same *Bacillus* isolates were examined, (56,7%-46,7%-43,3%) positivity was observed in the raw milk samples, (71%-80,6%-45,2%) in the cheese samples, and (66,7%-66,7%-33,3%) in the ice cream samples, while, in the gelatin and siderophore tests, (76,7%-63,3%) positivity was determined in the raw milk samples, (77,4%-64,5%) in the cheese samples, and (66,7%-50%) in the ice cream samples. The hemolysis activity of all the *Clostridium* isolates isolated from raw milk and ice cream was found to be positive. When the proteolytic, lipolytic, lecithinase, and enzyme activities of the *Clostridium* isolates were examined, they all were found negative in the raw milk samples, and in the cheese samples they were found (100%-25%-75%) positive. The *Bacillus* species that were isolated in our study showed resistance to the penicillin, ampicillin, erythromycin, bacitracin, and novobiocin antibiotics.

Science Code : 2034
 Key Words : *Bacillus*, *Clostridium*, Raw Milk, Cheese, Ice Cream, Enzyme, Pathogenicity, Biofilm
 Page Number : 137
 Supervisor : Prof. Dr. Nihal YÜCEL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca, her aşamada desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, karşılaştığım problemlerin çözümünde, bilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, görüş ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Nihal YÜCEL'e, daima yakın ilgi ve desteğini gösteren kıymetli hocam Prof. Dr. Murat EKİCİ'ye, Doç. Dr. Fatma Gökçe APAYDIN'a en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimine çok teşekkür ederim. Ayrıca bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, her türlü desteğini benden esirgemeyen ve sürekli yanımda olan canım aileme, teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma "Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi" tarafından desteklenmiştir.

Proje no: 05/2016-06



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xv
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. <i>Bacillus licheniformis</i> 'in genel özellikleri.....	6
2.1.2. <i>Bacillus subtilis</i> 'in genel özellikleri.....	7
2.1.3. <i>Bacillus cereus</i> 'un genel özellikleri.....	8
2.1.4. <i>Bacillus brevis</i> 'un genel özellikleri.....	10
2.1.5. <i>Bacillus megaterium</i> 'un genel özellikleri	10
2.1.6. <i>Bacillus circulans</i> 'in genel özellikleri	10
2.2. <i>Clostridium</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	11
2.2.1. <i>Clostridium sporogenes</i> 'in genel özellikleri.....	18
2.2.2. <i>Clostridium beijerinckii</i> 'nin genel özellikleri	20
2.2.3. <i>Clostridium bifermentans</i> 'in genel özellikleri	20
2.2.4. <i>Clostridium sordellii</i> 'nin genel özellikleri.....	21
2.3. Gıda Kaynaklı Hastalıkların Meydana Gelmesi.....	22
2.4. <i>Bacillus spp.</i> ve <i>Clostridium spp.</i> Antimikrobiyal Direnci	32

	Sayfa
2.5. Biyofilm ve Gıda Endüstrisinde Önemi	32
2.6. Süt ve Süt Ürünlerinde <i>Bacillus</i> ve <i>Clostridium</i> Türlerinin Yapmış Olduğu Bozulmalar	35
3. MATERYAL VE METOD	41
3.1. <i>Bacillus spp.</i> 'nin İzolasyonu	41
3.2. <i>Bacillus spp.</i> 'nin İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri.....	42
3.3. <i>Clostridium spp.</i> 'nin İzolasyonu	43
3.4. <i>Clostridium spp.</i> 'nin İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri.....	44
3.5. İdentifikasyonda Kullanılan Besiyerleri, İçerikleri ve Testlerin Yapılışı	46
3.5.1. Gram boyama	46
3.5.2. Katalaz testi	46
3.5.3. Üreaz testi.....	47
3.5.4. İndol testi.....	48
3.5.5. Sitrat testi	49
3.5.6. Metil Red (MR)-Voges-Proskauer (VP) testi	50
3.5.7. Triple Sugar Iron Agar (TSI)	52
3.5.8. Karbonhidrat testleri.....	54
3.6. Enzimatik ve Patojenik Özelliklerin Aranmasında Kullanılan Testler	55
3.6.1. Proteolitik aktivite testi	55
3.6.2. Lipolitik aktivite testi	56
3.6.3. Lesitinaz testi	57
3.6.4. DNaz testi.....	58
3.6.5. Jelatin hidrolizi.....	59
3.6.6. Hemoliz testi	60
3.6.7. Siderefor testi	61
3.7. İzole Edilen <i>Bacillus</i> Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	63

Sayfa

3.7.1. <i>Bacillus</i> türlerinin biyofilm varlığının tespit edilmesinde kullanılan besiyerleri ve içerikleri.....	65
3.8. İzole Edilen <i>Clostridium</i> Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	65
3.8.1. <i>Clostridium</i> türlerinin biyofilm varlığının tespit edilmesinde kullanılan besiyerleri ve içerikleri.....	68
3.9. Kongo Red Bağlama (Slime Faktör Testi).....	69
3.10. <i>Bacillus</i> izolatlarının BBL Crystal Identification System Gram-Positive ID Kit Kullanılarak Tür Seviyesinde Adlandırılması	70
3.11. <i>Clostridium</i> İzolatlarının 16S rRNA Gen Dizisine Göre Adlandırılması	74
3.12. <i>Bacillus</i> ve <i>Clostridium</i> Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	75
4. BULGULAR	77
4.1. <i>Bacillus spp.</i> Mikroplate İle Biyofilm Ölçüm Sonuçları.....	84
4.2. <i>Bacillus spp.</i> Congo Red Agar (CRA) ile Biyofilm Ölçüm Sonuçları.....	92
4.3. <i>Clostridium spp.</i> RCM ve TSB+%1 Glukoz Kullanılarak Mikroplate ile Biyofilm Ölçüm Sonuçları	95
4.4. <i>Clostridium spp.</i> Congo Red Agar (CRA) ile Biyofilm Ölçüm Sonuçları	100
4.5. Enzim Aktivitesi ve Patojenite ile İlgili Yapılan Biyokimyasal Test Sonuçları .	101
4.5.1. Hemoliz testi sonuçları.....	102
4.5.2. DNaz enzim testi sonuçları	103
4.5.3. Proteolitik enzim aktivite testi sonuçları.....	104
4.5.4. Lipolitik enzim aktivite testi sonuçları.....	106
4.5.5. Fosfolipaz (Lesitinaz) enzim aktivite testi sonuçları	107
4.5.6. Jelatinaz enzim aktivite testi sonuçları.....	108
4.5.7. Siderefor aktivitesi testi sonuçları.....	109
4.6. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları.....	110
5. TARTIŞMA	117
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	125

Sayfa

KAYNAKLAR	127
ÖZGEÇMİŞ	137



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı <i>Bacillus</i> türleri ve oluşturdıkları infeksiyonlar.....	6
Çizelge 2.2. Bazı <i>Clostridium</i> türlerinin kanlı agar'da karakteristik görüntüsü.....	13
Çizelge 2.3. <i>Clostridium</i> türlerinin bazı karakteristik özellikleri ve önemi.....	14
Çizelge 2.4. Bazı <i>Clostridium spp.</i> ve yapmış olduğu hastalıklar	15
Çizelge 2.5. Sakkarolitik, proteolitik ve diğer <i>Clostridium spp.</i>	18
Çizelge 2.6. Bazı <i>Clostridium</i> türlerinin tedavisinde antibiyotik seçimi	18
Çizelge 3.1. TSI'da sonuçların değerlendirilmesine yönelik kriterler.....	54
Çizelge 3.2. BBL identifikasyon sisteminin içerdiği testlerin prensipleri	71
Çizelge 4.1. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> ve <i>Clostridium</i> türlerinin çalışılan örnek sayısına göre dağılımları	77
Çizelge 4.2. İzole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin incelenen gıda örneklerine göre dağılımları.....	78
Çizelge 4.3. İzole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin incelenen gıda örneklerine göre dağılımları.....	79
Çizelge 4.4. İzolasyonu gerçekleştirilen <i>Bacillus</i> türlerinin izolat numaraları ve çalışılan örneklere göre dağılımı.....	81
Çizelge 4.5. İzolasyonu gerçekleştirilen <i>Clostridium</i> türlerinin izolat numaraları ve çalışılan örneklere göre dağılımı.....	83
Çizelge 4.6. İzole edilen <i>Bacillus spp.</i> ve <i>Clostridium spp.</i> ortak izolat numaraları.....	83
Çizelge 4.7. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları.....	84
Çizelge 4.8. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları.....	86
Çizelge 4.9. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> izolatlarının TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat inkübasyon sonucundaki tutunma durumları.....	88
Çizelge 4.10. TSB+%1 Glukoz besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları	90

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.11. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> izolatlarının 37 °C 'de TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat sonundaki tutunmaları ve tutunma yüzdeleri.....	90
Çizelge 4.12. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçları.....	92
Çizelge 4.13. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçlarının yüzdeleri.....	94
Çizelge 4.14. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin RCM kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları.....	95
Çizelge 4.15. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin RCM kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları.....	95
Çizelge 4.16. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları	96
Çizelge 4.17. Çiğ süt. peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları	96
Çizelge 4.18. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> izolatlarının RCM'de 24 ve 48 saat inkübasyon sonucundaki tutunma durumları	97
Çizelge 4.19. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> izolatlarının TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat inkübasyon sonucundaki tutunma durumları	97
Çizelge 4.20. RCM besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları	98
Çizelge 4.21. TSB+%1 Glukoz besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları	98
Çizelge 4.22. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> izolatlarının 37 °C'de RCM 'de 24 ve 48 saat sonundaki tutunmaları ve tutunma yüzdeleri	98
Çizelge 4.23. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> izolatlarının 37 °C'de TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat sonundaki tutunmaları.....	99
Çizelge 4.24. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçları.....	100

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.25. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçlarının yüzdeleri.....	100
Çizelge 4.26. İzole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin bazı enzim aktivitesi ve patojenitesine yönelik yapılan testlerin sonuçları.....	101
Çizelge 4.27. İzole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin bazı enzim aktivitesi ve patojenitesine yönelik yapılan testlerin sonuçları.....	101
Çizelge 4.28. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin hemoliz sonuçları.....	102
Çizelge 4.29. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin Hemoliz sonuçları.....	103
Çizelge 4.30. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin DNaz sonuçları	103
Çizelge 4.31. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin DNaz sonuçları	104
Çizelge 4.32. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin Proteolitik enzim aktivite sonuçları.....	104
Çizelge 4.33. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin Proteolitik enzim aktivite sonuçları.....	105
Çizelge 4.34. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin Lipolitik enzim aktivite sonuçları.....	106
Çizelge 4.35. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin Lipolitik enzim aktivite sonuçları.....	107
Çizelge 4.36. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin Fosfolipaz (Lesitinaz) enzim aktivite sonuçları.....	107
Çizelge 4.37. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin Fosfolipaz (Lesitinaz) enzim aktivite sonuçları.....	108
Çizelge 4.38. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin Jelatinaz enzim aktivite sonuçları.....	108
Çizelge 4.39. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin Jelatinaz enzim aktivite sonuçları.....	109
Çizelge 4.40. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin Siderefor aktivite sonuçları.....	109
Çizelge 4.41. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türlerinin Siderefor aktivite sonuçları.....	110

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.42. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus spp.</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	111
Çizelge 4.43. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus spp.</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları ve yüzdeleri.....	113
Çizelge 4.44. İzole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin bazı antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç (R) sayı ve yüzdeleri.....	114
Çizelge 4.45. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>B. subtilis</i> 'in antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve yüzdeleri	114
Çizelge 4.46. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>B. cereus</i> 'un antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve yüzdeleri	115

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Fermantasyon sırasında <i>C. acetobutylicum</i> 'un farklı hücre formları ve başlıca ürünleri ile genel hücre döngüsü	17
Şekil 4.1. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türleri ve yüzdeleri	78
Şekil 4.2. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen <i>Clostridium</i> türleri ve yüzdeleri.....	79
Şekil 4.3. 16S rRNA gen bölgesine göre tanımlanan <i>Clostridium</i> türlerinin filogenetik ağacı	80

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>B. subtilis</i> ve sporları	8
Resim 2.2. <i>B. cereus</i> sporları	9
Resim 2.3. <i>C. sporogenes</i> ve davul tokmağı görünümde ki sporları	19
Resim 2.4. <i>C.bifermentans</i> mikroskopik görüntüsü	21
Resim 2.5. <i>C.sordellii</i> mikroskopik görüntüsü	22
Resim 2.6. <i>Clostridium</i> gelişimi görülen peynir örnekleri [129].....	38
Resim 3.1. Nutrient Agar'da üremiş <i>Bacillus spp.</i>	42
Resim 3.2. Bakteri süspansiyonu içeren BBL Crystal GP ID Panelleri	42
Resim 3.3. Anaerob koşullarda Bryand and burkey medium'da üreyen <i>Clostridium</i> izolatları	44
Resim 3.4. Reinforced Clostridial Agar 'da üremiş <i>Clostridium</i> suşu	45
Resim 3.5. Katalaz testi; A: Katalaz negatif; B: Katalaz pozitif	46
Resim 3.6. Üreaz testi; A: Üreaz negatif; B: Üreaz pozitif	47
Resim 3.7. İndol testi; A: İndol pozitif; B: İndol negatif.....	49
Resim 3.8. Sitrat testi; A: sitrat pozitif; B: sitrat negatif	50
Resim 3.9. Metil red testi; A: Metil red pozitif; B: Metil red negatif.....	52
Resim 3.10. VP- testi; A: Voges-Proskauer pozitif; B: Voges-Proskauer negatif.....	52
Resim 3.11. TSI testi sonucu renk değişimleri	53
Resim 3.12. Karbonhidrat fermentasyon testi; A: Pozitif sonuç; B: Negatif sonuç	55
Resim 3.13. Proteolitik Aktivite testi; A: Pozitif sonuç; B: Negatif sonuç	56
Resim 3.14. Lipolitik aktivite sonucu zon oluşumu	57
Resim 3.15. Lesitinaz (Fosfolipaz) aktivitesi görüntüsü	58
Resim 3.16. DNaz aktivitesi görüntüsü	59
Resim 3.17. Jelatin testi; A: Jelatin hidrolizi pozitif; B: Jelatin hidrolizi negatif.....	60
Resim 3.18. Hemoliz testi; A: Pozitif sonuç B: Negatif sonuç.....	61

Resim	Sayfa
Resim 3.19. Siderefor testi; A: Pozitif sonuç B: Negatif sonuç.....	62
Resim 3.20. Bakteri solüsyonundan ilave edilen mikropate kuyucukları.....	63
Resim 3.21. Kristal viyole ilave edilen mikropate kuyucukları	64
Resim 3.22. Distile su ile yıkanılıp kurutulan mikropateler	64
Resim 3.23. Etanol çözeltisi ilave edilen mikropateler	64
Resim 3.24. Bakteri solüsyonundan ilave edilen mikropate kuyucukları.....	66
Resim 3.25. Bakteri solüsyonundan ilave edilen mikropate'lerin anaerobik ortamda inkübasyonu	66
Resim 3.26. Kristal viyole ilave edilen mikropate kuyucukları	66
Resim 3.27. Distile su ile yıkanılıp kurutulan mikropateler	67
Resim 3.28. Kristal viyole ilave edilen mikropate kuyucukları	68
Resim 3.29. 1:1 oranda etanol-aseton çözeltisi içeren kuyucuklar	68
Resim 3.30. Slime faktör testi.....	70
Resim 3.31. 0,5 McFarland bulanıklık tüpüne göre ayarlanan bakteri kültürü içeren hazır kit broth	73
Resim 3.32. BBL Crystal Panel Viewer Cihazı.....	73
Resim 3.33. BBL Crystal Gram-Positive Identification Color Chart Tablosu	74
Resim 3.34. Antibiyotik duyarlılık testi.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklamalar

%	Yüzde
°	Derece
μ	Mikron
μl	Mikrolitre
β	Beta
α	Alfa
μm	Mikrometre

Kısaltmalar Açıklamalar

ABE	Aseton Bütanol Etanol
ADP	Adenozin Difosfat
AK	Amikasin
AMP	Ampisilin
APS	Alkali Peptonlu Su
ATP	Adenosin Trifosfat
B	Basitrasin
BBB	Bryant And Burkey Broth
BD	Becton Dickinson
BoNT	Botulinum Nörotoksini
C	Kloramfenikol
CAS	Chrome Azurol Sulphate
CRA	Congo Red Agar
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E	Eritromisin
EMS	En Muhtemel Sayı
g	Gram

Kısaltmalar**Açıklamalar**

H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HACCP	Hazard Analysis And Critical Control Point
HCl	Hidroklorik Asit
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HT	Hemorajik Toksin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
l	Litre
LT	Lethal Toxin
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MR	Metil Red
NCCLS	National Comittee For Clinical Laboratory Standarts
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NV	Novobiosin
OD	Optical Density
P	Penisilin
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Power Of Hydrogen
RCA	Reinforced Clostridial Agar
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
sn	Saniye
spp	Subspecies (Alt Tür)
ST	Stabil Toksin
TE	Tetrasiklin
TSB	Tryptic Soy Broth
TSI	Triple Sugar Iron
UHT	Ultra High Temperature
VA	Vankomisin
VP	Voges Proskauer

1. GİRİŞ

İnsanların yeterli ve dengeli beslenmesinde hayvansal kaynaklı gıdalar en önemli besin maddeleridir. Bunlardan süt, insanların yaşamları boyunca doğrudan veya ürünleri şeklinde tükettikleri besin kaynağı olup içermiş olduğu protein, yağ, laktoz, mineral madde ve vitaminler ile insan beslenmesinde önemli bir yer tutar. Süt hayvan memesinden sentezlenmeye başladığı andan itibaren muhafazası, işlenmesi, tüketilmesi arasında sürekli mikroorganizmalarla etkileşim halindedir. Çiğ süt, içerdiği mikroorganizma ve enzimlerin etkisiyle değişime uğrar, sütün tat, koku ve teknolojik niteliklerinde bozulmalar meydana gelir. Sütün üretimi ve depolama koşulları sırasındaki ısı, zaman ve pH gibi faktörler mikroflora üzerinde etkilidir. Tüm bu faktörlere bağlı olarak işlenmemiş çiğ sütün içerdiği mikroorganizma sayısı sütün kalitesini belirler. İnekten yeni sağılmış sütte 10^4 /ml mikroorganizma bulunur. Literatürlere göre yüksek kaliteli içme sütünde bu sayının 500.000 adet/ml geçmemesi istenir [1, 2].

Sütün pıhtılaşmasıyla elde edilen peynir belli bir olgunlaşma dönemi geçirdikten sonra tüketilir. Tüm dünyada sevilerek tüketilen peynir %10-30 arasında protein içerir ve bileşiminden vücudumuzda sentezlenmeyen temel amino asitler ile kalsiyum ve fosfor içeren zengin bir gıdadır. Aynı zamanda (A, D, E, K) ve suda çözünen (B2, B6, B12) vitaminler açısından da zengindir. Ev yapımı Türk beyaz peynirinin yapımında genellikle çiğ süt ve pastörize edilmemiş süt kullanılır. Peynirde bulunan mikroorganizmalarda peynirin yapısının değişmesine neden olacağı gibi tüketilmesi sonucunda gıda zehirlenmelerine de yol açabilirler [3, 4].

Sağım sonrasında süte kontamine olan mikroorganizmalar bulaşma kaynaklarına göre değişiklik gösterebilmektedir. Süt; dışkı ve hayvan derisi ile koliformlar, *Bacillus*, *Clostridium* ve *Salmonella* ile; topraktan *Streptomyces*, sporlu bakteriler, küf saporları ile; yataklık ve yemlerden, *Lactobacillus* türleri, *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* (slaj kökenli) ile; sağım ekipmanları ve sütün depolandığı kaplardan laktik flora, micrococcus türleri, *lactobacillus* türleri, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* türleri, *Acinetobacter* ve maya türleri ile; personel kaynaklı olarak *Staphylococcus* türleri, fekal kontaminantlar yoluyla; kontamine olabilmektedir.

Süt ve süt ürünlerinde patojen bakterilerin vejetatif formlarının yok edilmesi amacı ile çiğ süte pastörizasyon uygulanır. Pastörizasyon mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesinde etkili yöntemlerden birisi olup, aynı zamanda süt hijyenini sağlayan bir uygulamadır. Pastörizasyon işlemi ile çiğ sütün başlangıçta içerdiği mikroorganizmaların hepsi öldürülememektedir. Uygulanan yetersiz pastörizasyon veya pastörizasyon sonrası kontaminasyon sonucu sütte patojen mikroorganizmalar bulunabilir ve insanlarda gıda kaynaklı hastalıkların oluşumuna yol açabilirler. Özellikle sporlu olan mikroorganizmalar sütte pastörizasyon sonrası varlıklarını devam ettirmektedir. Sporlu aerob olan mikroorganizmalardan *Bacillus*'lar süte kontamine olduklarında sporları ile yüksek ısıya dayanıp, pastörizasyon sonrasında kolaylıkla canlılıklarını sürdürebilmektedir [5, 6].

Bacillus'lar proteolitik, lipolitik, fosfolipaz ve beta-laktamaz enzimlerinin etkisiyle, süt ve süt ürünlerinin kalitesini belirlemektedirler. Yağları ve proteinleri parçalama yeteneklerinin çok yüksek olması nedeniyle *Bacillus*'lar sürekli çürüme ve bozulmalara sebep olabilmektedirler [7].

Bacillus ve *Clostridium*'lar sporlu bakteriler olması sebebi ile yüksek sıcaklıklara zorlu şartlara karşı dayanıklıdır. Biyofilm oluşturması halinde bu bakterilerin dayanıklılıkları daha da artmaktadır. *B. cereus* çiğ sütün genel bir kontaminantıdır. Kolayca cam, çelik yüzeylere yapışır. Yüzeye yapışan sporların dezenfekte edilmeleri güçleşir. Çeşitli dezenfektan, antibiyotiklerle ortamdan uzaklaştırılmasını zorlaştırır. Süt endüstrisinde kullanılan malzemelerde bu tür biyofilmlerin oluşumu pastörizasyon sonrası bulaşmalara da neden olur [8].

Süt ürünlerinde bulunan en yaygın spor oluşturan bakteriler *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine aittir. Çiğ sütlerde bu bakterilerin bulunması çiğ sütlerde bulunması mevsimlere göre de değişiklik göstermektedir. Yüksek sıcaklık ve zor koşullarda sporları ile dayanıklılık göstermeleri, süt endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olmaları ve gıda kaynaklı hastalıklara sebebiyet vermeleri nedeni bu bakteriler dikkat çekerler [9].

Tüm bu durumlar göz önüne alınarak çalışmamızda tüketime sunulan süt ve süt ürünlerinden izole edilen *Bacillus* ve *Clostridium* türleri varlığı ve kontaminasyon düzeyleri belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan bu bakterilerin bazı enzim aktiviteleri ile birlikte patojenite faktörleri, biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır.

madde üreticisi *Bacillus* 'lar; *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. thermoleovorans*, *B. cereus*, *B. coagulans* ve *B. amyloliquefaciens*'dir [14].

Proteinaz enzimi üretiminde kullanılan bazı *Bacillus* türleri; *B. subtilis*, *B. mesentericus* ve *B. stearothermophilus*'dir. Bu enzim protein bulanıklığının alınmasında stabilize edici, et ve balık etlerinin yumuşatılması, şarap ve bira endüstrisinde kullanılmaktadır. *B. subtilis*, *B. thermoleovorans*, *B. thermocatenulatus*, *B. coagulans* lipaz üreten bazı *Bacillus* türleridir. Lipaz enzimi genellikle süt ürünlerinde ve gıda endüstrisinde süt yağlarının hidrolizi için kullanılır. Lipaz enzimi süt yağlarını parçalayıp yağ asitlerini serbest hale geçirerek pek çok süt ürününe tipik lezzet ve kokuyu kazandırır. Ayrıca kağıt, kozmetik, ilaç ve deterjan endüstrisi ile ziraat alanında da kullanılırlar [15, 16].

Bacillus 'lar çoğu durumlarda prokaryotik β -1,4-glukanazlar, selülozun sadece çözünebilir formlarına ait glikosidik bağların hidrolizini katalizlemektedir. Hücre dışı mikrobiyal β -glukanaz, bira endüstrisinde, zirai atıkların dönüşümünde ve fungal bitki patojenlerinin biyolojik olarak kontrolünde kullanılmaktadır [17].

Bakteriyel α -amilaz enzimi üretiminde *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* kullanılırlar. Ayrıca amilaz ve amilodekstrini dekstrinlere parçalayabilirler. *Bacillus* 'ların ürettiği endüstriyel enzimlerden nötral proteazlar süt endüstrisinde kullanılmaktadır [4].

Bacillus türleri tabiatта saprofit olarak bulunmaktadırlar. Gıdalarda bulunan *Bacillus* 'ların hepsi patojen değildir. *B. cereus* insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olur. *B. cereus* 'un neden olduğu gıda zehirlenmeleri mikrobiyal gıda zehirlenmeleri içinde önemli bir yer tutmaktadır. Diğer *Bacillus* türlerinin neden olduğu gıda zehirlenmeleri de bildirilmektedir (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*). Bu mikroorganizmalar, *B. cereus* tarafından üretilen ve kusmaya neden olan toksine benzer ve ısıya dayanıklı toksin üretmektedirler. Ancak travma, yanık ve değişik şekilde immünitesi baskılanmış hastalarda potansiyel patojendirler. Birçok *Bacillus* 'un patojenitesinde rol oynayan antimikrobiyal özellikte madde, enzim, pigment ve bir kısmında toksin gibi hücre dışı madde salgıladıkları gösterilmiştir [18, 8].

İnsan ve hayvanlarda şarbon hastalığı etmeni olan bakteri *B. anthracis*'dir. Toksinler *B. anthracis*'in patojenitesinde etkilidirler. Toksinleri protein yapısındadır. Şarbon sporları organizmaya girişine göre üç farklı formda hastalık oluşturur. Bunlar deri şarbonu, akciğer şarbonu, gastrointestinal şarbon'dur. İnsanlarda hastalığın en sık rastlanan formu, yaralı deri veya mukoza membranı yoluyla edinilen deri şarbonudur. Akciğer şarbonu ise, genellikle hayvanın temas edilen kıl veya derilerindeki spor içeren tozun solunmasından kaynaklanır. Gastrointestinal şarbonun enfeksiyon kaynağı ise *B. anthracis* sporları ile bulaşmış besin maddeleridir. Özellikle çiğ tüketilen ve sonradan sporları bulaşmış et, süt ve diğer besin maddeleri oldukça tehlikelidir. Klinik gastrointestinal anthrax nadirdir, fakat enfekte olmuş hayvanın etinin yenmesiyle ilgili olarak salgın şeklinde meydana gelebilir. *B. anthracis* in vitro birçok antimikrobiyallere duyarlıdır. Penisilin grubu antibiyotikler öncelikli olarak tercih edilmelidir. Ancak allerjisi olanlarda, eritromisin, tetrasiklinler, kloramfenikol ve birinci kuşak sefalosporinler alternatif olarak seçilebilecek antibiyotiklerdir [19].

B. coagulans ve *B. stearothermophilus* özellikle konserve gıdalarda bozulmalara neden olurlar. *B. stearothermophilus* sporları, sıcaklığa en dirençli sporlardır. *B. thuringiensis*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. larvae* ve *B. sphaericus* gibi bazı türler böcek patojenidir. *B. subtilis*, subtilin adlı bir bakteriyosin üretmektedir. *B. licheniformis* basitrasin, *B. polymyxa* ise polimiksin antibiyotiklerinin üretiminde kullanılır [15, 20].

Çizelge 2.1. Bazı *Bacillus* türleri ve oluşturdıkları infeksiyonlar

İzolat	Klinik tablo
<i>B. anthracis</i>	Şarbon, sepsis, menenjit
<i>B. (paenibacillus) alvei</i>	Sepsis, menenjit, pnömoni, ampiyem, protez, kalça infeksiyonu, yara infeksiyonu
<i>B. brevis</i>	Bakteriyemi, kornea infeksiyonu, besin zehirlenmesi
<i>B. cereus</i>	Besin zehirlenmesi, yara infeksiyonu, bakteriyemi, sepsis, pnömoni, ampiyem, endokardit, osteomyelit, oftalmik, menenjit, beyin apsesi, akciğer apsesi, emetik toksine bağlı karaciğer yetmezliği
<i>B. circulans</i>	Menenjit, sepsis, endokardit
<i>B. coagulans</i>	Kornea infeksiyonu, bakteriyemi
<i>B. licheniformis</i>	Besin zehirlenmesi, sepsis, oftalmik, peritonit
<i>B. pumilus</i>	Rektal fistül infeksiyonu
<i>B. sphaericus</i>	Menenjit, bakteriyemi, endokardit
<i>B. subtilis</i>	Bakteriyemi, sepsis, pnömoni, endokardit, ventriküloatriyal sant. infeksiyonu, üriner sistem infeksiyonu, otit, besin zehirlenmesi
<i>B. thuringiensis</i>	Yara infeksiyonu, kornea infeksiyon

2.1.1. *Bacillus licheniformis*'in genel özellikleri

B. licheniformis, çubuk şeklinde, gram pozitif, termofilik bir bakteridir. Uygun olmayan koşullarda spor oluşturlarken normal şartlar halinde vejetatif hallerine dönerler. Sporları toprakta bulunur ve ısısal işlemlere dayanıklıdır. Optimum gelişme sıcaklığı 50 °C civarında olmakla birlikte daha yüksek sıcaklıklarda da canlı kalabilmektedir. Glukozu aerobik koşullarda fermente ederek oluşturduğu 2,3-butandiol ve gliserol en önemli karakteristik özellikleridir [21].

Salgıladığı çeşitli enzim, antibiyotik ve küçük metabolitler ile endüstriyel olarak önemlidir. Enzim salgılaması için en uygun sıcaklık 37 °C'dir. *B. licheniformis*, 9-10 gibi yüksek pH seviyelerinde hayatta kalabilen bir proteaz üretir. Proteaz çamaşır deterjanı içinde, düşük sıcaklıklarda da etkili olması nedeniyle, çamaşırlarda ki renklerin solması gibi durumları önler [22].

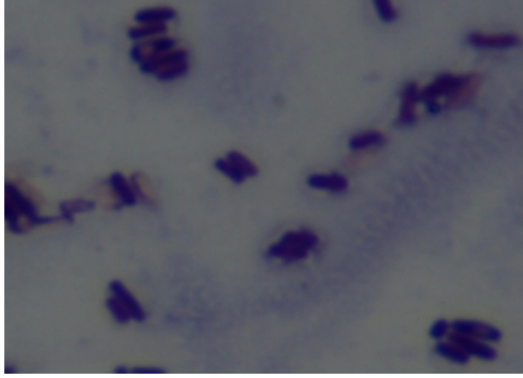
B. licheniformis, *B. subtilis* ve *B. pumilus* ile birlikte subtilis grubunun bir parçasıdır. Bu bakterilerin yaygın olarak gıda zehirlenmesine veya bozulmalara neden olduğu bilinmektedir. *B. licheniformis*, aynı zamanda süt ürünleri için bir kontaminant olup bu

bakteriye bağılı gıda kaynaklı zehirlenmeler genellikle pişmiş et, sebzeler, çiğ süt ve bebek mamaları gibi gıdalarla ilişkilendirilmiştir. Tıpta önemli bir antibiyotik olan Bazitrasin antibiyotiğinin üretilmesinde bu bakteri kullanılır [2].

2.1.2. *Bacillus subtilis*'in genel özellikleri

B. subtilis sporları ile doğada yaygın olup toprak, gübre, süt ve sularda bulunan bu bakteri çubuk şeklinde, yaklaşık 1.5-3 µm boyunda, 0.5-0.8 µm eninde, kapsülsüz, hareketli, gram pozitif bakterilerdir. *B. subtilis* mezofilik sıcaklık aralığında gelişir. Üremesi için en uygun sıcaklık 25-35 °C'dir. Suşlarının çoğu kahverengi pigmentli spor yapar. Bakterinin sporları 116-140 °C'de 12-30 dakika kadar dayanıklılık gösterir. Besin kıtlığı ya da çevresel stresler gibi durumlarda *B. subtilis* hücreleri hayatlarını sürdürmek için birçok farklı uyum yolları geliştirirler. Strese dirençli endosporlar oluştururlar. Yüksek adaptasyon kabiliyeti ile zorlu yaşam koşullarına uyum gösterirler. Kolonileri yuvarlak veya düzensiz, kirli-beyaz, gri, bazen kahverengi olabilir, yüzeyi mat, opak, buruşuk olup kenarları pürüklü ve R tipindedir [23, 24].

B. subtilis, bakterilerde endospor oluşumunu incelemek için kullanılan model mikroorganizmadır. *B. subtilis* bakterilerindeki endosporlar hücrenin uç kısımlarındadır. Karbon, azot veya fosfor tükenmesi, sporülasyon sürecinin başlamasına neden olur. Eğer çevresel koşullar, hızlı büyüme evresinin sonlarında, optimum büyüme şartlarında aşağı doğru saparsa *B. subtilis* bu kısıtlı çevresel durumdan kaçabilmek adına, motilite (hareketlilik) kazandıracak kimyasala yönelme özelliğini geliştirmektedir. Eğer durağan büyüme evresinde hala besinsel kısıtlılık devam ediyorsa, bu hücreler, proteazlar gibi çevredeki alternatif gıda kaynaklarını parçalayabileceği enzimler ve/veya kendisini bulunduğu ortamda üstün kılacak antibiyotikler üretmekte ve dış ortama salmaktadır. En son durak olarak, tüm bu koşulların yetersiz kaldığı sürede besinsel kıtlık durumlarında spor oluşturmaktadır. Sporlanma adaptasyonda gelinebilecek son duraktır, bakterinin ortam koşulları düzelene kadar hayati fonksiyonlarını askıya alması olarak tanımlanabilir. Bakterilerin büyümesi için gerekli besin maddeleri bol olduğu zaman, metabolik aktivite gösterirler [25].



Resim 2.1. *B. subtilis* ve sporları

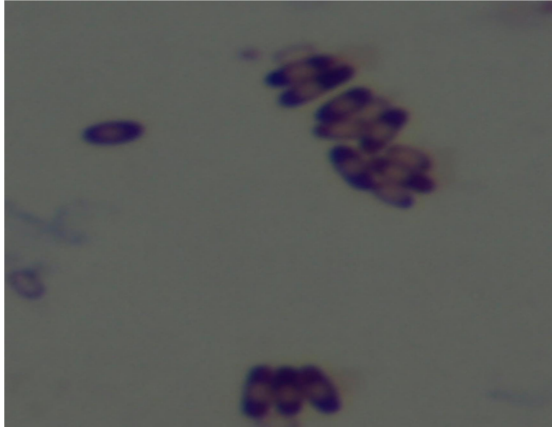
B. subtilis bakterileri "amilaz, proteaz, pullulanaz, kitinaz, ksilanaz, lipaz gibi enzimler salgılar. Bu enzimler ticari olarak üretilir ve bu enzim üretimi ticari olarak üretilen endüstriyel enzimlerin yaklaşık %60'ını oluşturur. Bu organizmalar sporlanma aşamasında çeşitli antibiyotikler üretebilirler. *B. subtilis*'in üretebileceği antibiyotikler polimiksin, diffidin, subtilin ve mikobasilindir [26].

B. subtilis'in ürettiği subtilin, gözde panaftolmi, iridoksilit, göz yangınlarına neden olurken ekmek ve gıda maddelerinin bozulmalarına yol açar [8].

Klinik olarak kateter kullananlarda endokardit gibi infeksiyonlara yol açmaktadır. *B. subtilis* sütte kesilmeye (koagülasyon) patates yumrularında çürümeye neden olur. Et ve balık sularında bulanıklık meydana getirerek ince bir zar tabakası oluşturur [27].

2.1.3. *Bacillus cereus*'un genel özellikleri

B. cereus, 1x3-4 µm çapında, gram pozitif, çubuk şeklinde, endospor oluşturan, fakültatif aerobik bakteridir. Toprak, su, bitki, yumurta, et ve süt ürünleri gibi birçok yerde yaygın olarak bulunurlar. Optimum üreme sıcaklığı genellikle 30°C'dir. Maksimum üreme sıcaklığı 37 - 48 °C arasındadır. Sporların gelişimi için optimum sıcaklık 30 °C, minimum -1 °C ve maksimum 59 °C'dir. Gelişebildiği pH optimum 7,0'dır [28].



Resim 2.2. *B. cereus* sporları

B. cereus çiğ sütün genel bir kontaminantıdır. Isıl işlem sırasında veya sonrasında gıda zehirlenmelerine yol açarlar. Gastrointestinal enfeksiyonlar ile ilişkili toksinlerin yanı sıra birkaç potansiyel virülans faktörleri ile önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. *B. cereus*'un virülans faktörleri arasında nekrotizan ekzotoksin, emetik toksin, hemolizin, lesitinaz ve proteaz gibi enzimler bulunur [29].

B. cereus gıda yolu ile çok sayıda alındığında bireylerde gıda zehirlenmesi görülebilir. Gıda zehirlenmesi, gıda servis edilmeden önce yeterince soğutulmamasından ya da gıda hazırlanması ve tüketimi arası süre uzadığında ortaya çıkar. Süt içerisinde *B. cereus*'un üremesi protein, karbonhidrat ve vitamin kayıplarına yol açmaktadır. Oluşturduğu proteolitik ve lipolitik enzimlerle gıda bozulmalarına neden olurlar. Bazı serotiplerinde bakteri sayısı $\geq 10^6$ kob/g ulaştığında emetik veya diyare tipte iki tip toksin oluşturarak gıda zehirlenmelerine neden olurlar [30].

B. cereus'un özellikle immün sistemi baskılanmış hastalar, yenidoğanlar ve cerrahi yaralanmalar bulunan hastalarda fırsatçı bir patojen olarak lokal ve sistemik enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. *B. cereus*, keratit, endoftalmit ve panoftalmit gibi oküler enfeksiyonlara neden olabilir. Ayrıca, gangren, sığır mastiti, piyojenik enfeksiyonlar, bebek ölümü, septik menenjit, periodontal hastalık, akciğer apseleri ve endokardite neden olduğu görülmüştür [31].

B. cereus sütte yüksek miktarda ürediği zaman 'tatlı pıhtılaşma' denilen bozulmaya neden olur. Sporlu bakterilerin çiğ sütte bulunma nedeni hayvanın meme ucunun topraktan kontaminasyonudur. *B. cereus* sporu sütte ısıl işlem后会 sonra hızlıca çimlenir. Uygun

koşullar bulup çoğaldıklarında, çelik, cam ve lastik yüzeylerde oluşturdıkları biyofilm oluşturdıkları zaman yok edilmeleri güçleşir [14, 32].

2.1.4. *Bacillus brevis*'un genel özellikleri

B. brevis hareketli aerobik, 0.6-1.0 µm büyüklüğünde, elipsoidal spor oluşturan bir türdür. Sporları eliptiktir, glukozdan yavaş bir şekilde asit oluşturur veya asit oluşumu hiç yoktur. Bu bakteriden gramicidin ve tyrocidine denilen antibiyotikler elde edilir. *B. brevis*'in pek çok suşunun minimum besin ihtiyacı aminoasitlerdir. Toprak, süt, peynir gibi çeşitli gıdalardan izole edilirler. Gıda zehirlenmeleri ve tüketimi yolu ile hepatosellüler karsinomu (karaciğer tümörü) olan bireylerde peritonitte neden olur. Ayrıca kornea hastalıkları ve enfeksiyöz hastalıklarlada ilişkilidir [33, 34].

2.1.5. *Bacillus megaterium*'un genel özellikleri

Gram pozitif, genellikle hareketli, sporlu bakterilerdir. Besiyerindeki kolonileri oval veya silindirik, kahverengi ya da siyah olabilir. Nutrient agardaki koloniler 1,5 µm çapındadır. Glukoz agarda mukoid koloniler oluşturlar. Karbonhidratlı besiyerlerinde koloniler 3,0 µm veya daha büyüktür. Arabinoz, ksiloz ve mannitolden asit oluşturur, jelatini 22 °C'de sıvılaştırırlar. İnsanda gıda zehirlenmesine yol açar. Bazitrasin, gramisidin, polimiksin, subtilin gibi antibiyotikleri üretirler. *B. megaterium* toprak, deniz suyu, sediment, bal ve süt gibi çok çeşitli ortamlarda spor oluşturabilen bir bakteridir. Biyoteknolojik çalışmalar açısından önemli olup tıbbi, bilimsel ve endüstriyel olarak kullanabilecek çok sayıda farklı protein üretir. Vitamin B12 ve penisilin amidaz gibi biyomolekülleri sentezleyebildiği için ekonomik olarak önemlidir [35].

2.1.6. *Bacillus circulans*'ın genel özellikleri

B. circulans, gram pozitif, fakültatif anaerob, hareketli, çubuk şeklinde olup karbonhidrattan gaz oluşturmada asit oluşturmaktadır. Glukozlu besiyerinde anaerobik koşullarda üretilebilirler. Sporlarına toprakta rastlanır. Hücrelerin boyutu 2,0-4,2 x 0,5-0,8 µm'dir. Kolonileri 1-3 mm çapındadır. Optimum büyüme sıcaklığı 30 °C - 37 °C'dir. 6-9 aralığın'da bir pH'da büyüme vardır, ancak 7 pH'sı optimaldir. Nutrient agar da kolonileri incedir. Ayrıca krem renkli üreyen koloniler dışbükey ve düzensiz kenarlıdır. Bu bakteri fakültatif anaerob olması nedeniyle ortamda oksijen varsa ATP (Adenosin Trifosfat)'yi

aerobik solunumla üretebilirken, oksijen yoksa anaerobik solunumla da ATP üretebilmektedir. *B. circulans* endospor üretir. Sporları, bakteriyi olumsuz koşullardan korurken koşullar tekrar olumlu olduğunda bakteri vejetatif hale dönmektedir. Patojenik bir mikroorganizma olup bakteriyemi, apseler ve menenjitte neden olduğunda bilinmektedir. 2011 yılında immün yetmezliği olan bir hastada ölümcül sepsis (kan zehirlenmesi) yaratmıştır [14, 15, 36, 37].

2.2. *Clostridium* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Clostridium'lar Gram pozitif, spor oluşturan, çoğu anaerob, peritriş flagellaları ile hareketli, büyüklüğü 4-6 µm–1 µm arasında olan, katalaz ve peroksidaz negatif, gram pozitif basillerdir. *Clostridium* türleri tabiatta çok yaygın olup özellikle toprakda, suda, insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunurlar. Fizyolojik özellikleri termofilikten psikrofilğe, asidofilikten alkalifilğe kadar geniş bir çeşitlilik gösterir. Genellikle 35-37 °C' de ve pH 6,5-7 civarında iyi ürerler. Buna rağmen çoğu tür 15-69 °C arasında hem canlı kalıp hem de üreyebilmektedir. *Clostridium*'lar katı besiyerlerinde 37 °C'de 24-48-72 saat içinde ortası kabarık, düzenli veya düzensiz, kenarları çentikli, granüllü, bazen düzgün, filamentli görünümde, 2-4 mm çaplı, saydam koloniler oluşturur. Kanlı agar'da grimsi, nemli ve büyük boyda beta hemolitik koloniler meydana getirir [24].

Genelde sporların çapı basillerin çapından büyüktür. Basiller yüzük, tokmak, raket, mekik gibi çeşitli şekil alırlar. Sporlar; merkezde(central), uca yakın (subterminal) ve uçta (terminal) olacak şekilde yerleşebilirler. *Clostridium*'lar endosporları ile fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı daha dayanıklıdır. Endosporları öldürmek için otoklavda 120 °C 'de 10-15 dakika işlem uygulamak gerekmektedir.

Bazı önemli *Clostridium* türleri; *C. perfringens*, *C. bifermentans*, *C. butyricum*, *C. ramosum*, *C. difficile*, *C. clostridioforme*, *C. innocuum*, *C. sordellii*, *C. cadaveris*, *C. paraputrificum*, *C. sporogenes*, *C. tertium*, *C. septicum* ve *C. subterminale*'dir [38].

Clostridium türleri çok miktarda flavin enzimleri içerdiklerinden havanın oksijeni ile temas edince hidrojen peroksit meydana getirirler, bu da hücrelere toksik etki yapar. En önemli türler *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum* ve *C. difficile*'dir. Daha seyrek

olarak *C. septicum*, *C. ramosum*, *C. novyii*, *C. histolyticum* ve *C. bifermentans* klinik örneklerden izole edilir [39].

Gıdalarda bulunan önemli termofiller *Bacillus* ve *Clostridium* cinsleridir. Termofil olan türlerinin ortalama gelişme sıcaklık sınırları 45–75 °C'dir. Gıda endüstrisinde sterilizasyonda dikkate alınan termofilik bakterilerdir. Çünkü termofillerin yok edilmesi ile tüm bakteriler yok olur.

Filogenetik açıdan bakıldığında *Clostridium* cinsinin son derece heterojen olduğu görülmektedir. Türler, bazı morfolojik, yapısal ve fizyolojik özelliklerine göre tanımlanmaktadır. Son yapılan rRNA gen analiz sonuçlarına göre *Clostridium*'lar 5 yeni cins ve 11 yeni türde toplanmıştır. *Clostridium*'lar Firmicutes şubesinde yer almakta ve en az 12 neslin yer aldığı heterojen bir grubu oluşturmaktadır. *Clostridium*'larda G+C miktarı oldukça değişkendir (%22-55mol); ancak toksijenik türlerde G+C miktarı birbirleriyle benzerlik göstermektedir (%24-29 mol) [40].

Araştırmalar sonucunda 93 tip *Clostridium* suşu tespit edilmiş olup, bunlardan 55 tanesinin insanların barsak sistemleri, dışkıları, kanları, vücut sıvı ve boşlukları, bazı iç organlar ve yaralarda bulundukları bildirilmiştir. *Clostridium* cinsleri hemolizin, kollagenaz, lipaz, deoksiribonükleaz, hiyalürinidaz gibi çok çeşitli enzim ve ekzotoksin oluştururlar. Tabiatta bilinen en ölümcül ekzotoksinlerin de içinde bulunduğu yirmiden fazla farklı toksin sentezleyen *Clostridium*'lar, biyolojik aktif protein üretimi açısından en geniş çeşitliliğe sahip bakteri cinsini oluştururlar [39].

Çizelge 2.2. Bazı *Clostridium* türlerinin kanlı agar'da karakteristik görüntüsü

<i>Clostridium spp.</i>	Anaerob ortamda 24-48 saat inkübasyon sonunda kanlı agarda karakteristik görüntüsü
<i>C. perfringens</i>	Geniş, pürüzsüz, normal koloni ama pürüzlü ve düzensiz kenarlarda olabilir. Genellikle çift zonlu Beta hemoliz yapar. Lesitinaz üretir.
<i>C. botulinum/</i> <i>C. sporogenes</i>	Geniş iri düzensiz dairesel, pürüzsüz, grimsi, yarı saydam, yayılabilir. Beta hemolitik, lipaz üreten suşlardır.
<i>C. difficile</i>	Parlak, gri, yuvarlak koloni, kaba bir kenarlı, uv ışığında floresan sarı, genelde hemolitik olmayıp, karakteristik bir tarım arazisi kokusu
<i>C. novyi</i>	Yükseltilmiş, yuvarlak koloniler, kültürlerde düzleşmiş ve düzensizleşmiştir. Koloniler, beta hemolizin çift zonu ile büyüyen bir büyüme oluşturarak kaynaşma eğilimindedir. A tipi lesitinaz ve lipaz üretir.
<i>C. sordellii</i> <i>C. bifermentans</i>	Gri beyaz, dışbükey, yuvarlak koloniler yayılmış olabilir, bunlar beta hemolitik olabilir, lesitinaz, indol pozitif üretebilirler.
<i>C. septicum</i>	Genellikle dar bir beta-hemoliz zonu olan kalın bir bitki büyümesi üretir.
<i>C. tetani</i>	Beta hemoliz iyi gözükür.
Diğer <i>Clostridium spp.</i>	Koloniler görünüşleri değişir, ancak beta hemolitik olabilen veya olmayabilen genişleyen bir büyüme meydana getirebilir.

Vejetatif *Clostridium*'lar çevre koşullarına ve dezenfektanlara karşı dayanıklı değildir. Endosporları ile ise kuruluğa, ısı, radyasyon ve dezenfektanlara karşı dirençlidirler. Vejetatif hücreler, gastrik ve bağırsak proteolitik enzimlerin etkisine dirençli, çok aktif bir protein olan en kuvvetli toksini ürettiklerinden, gelişime uygun ortamlarda varlıkları tehlikelidir. Alkoller tarafından yok edilir, ancak nispeten ısıya dayanıklıdır, 75-80 °C'de 30 dakika boyunca dirençlidir ve sadece 10 dakika boyunca 100 °C'de inaktive edilir.

Çizelge 2.3. *Clostridium* türlerinin bazı karakteristik özellikleri ve önemi

<i>Clostridium spp.</i>	Bazı karakteristik özellikleri ve önemi
<i>C.aceteum</i>	Metabolik ürünleri olarak H ₂ , CO ₂ ve asetatdır. Terminal konumlu sporları vardır.
<i>C.acetobutylicum</i>	Asetat-bütanol fermantasyonunda kullanılan biotin ve p-aminobenzoat içeren basit sentetik ortamda büyüme gösterirler. Proteolitik ve sakkorilitk metabolizmaları vardır. Sporları terminal ya da subterminal konumda olabilirken jelatini hidrolize ederler.
<i>C.bifermantans</i>	Geniş çaplıdır, patojenik değildir. Proteolitik ve sakkorilitk metabolizmaları vardır. Sporları terminal ya da subterminal konumda olabilirken jelatini hidrolize ederler.
<i>C. chauvoei</i>	Hayvan patojenidir. Sakkorilitk metabolizmaları vardır. Sporları terminal ya da subterminal konumda olabilirken jelatini hidrolize ederler.
<i>C. haemolyticum</i>	Hayvan patojeni, oksijene aşırı duyarlıdır. Sakkorilitk metabolizmaları vardır. Sporları terminal ya da subterminal konumda olabilirken jelatini hidrolize ederler.
<i>C. histolyticum</i>	Çeşitli enfeksiyonlara ve miyonekroz neden olurlar. Proteolitik metabolizmaları vardır. Sporları terminal ya da subterminal konumda olabilirken jelatini hidrolize ederler.
<i>C. kluyveri</i>	Etanol ve asetatın fermantasyonu yaparlar. Terminal sporları vardır.
<i>C. pasteurianum</i>	Anaerobik azot fiksasyonu yapan toprak organizmasıdır. Sakkorilitk metabolizmaya sahiptir. Sporları sentral veya subterminaldir.
<i>C. putrefaciens</i>	Psikrotrofikdir. 37°C’de büyüme göstermez. Hem proteolitik hem sakkorilitk metabolizmaları vardır. Sporları terminal konumdadır. Jelatini hidrolize ederler.
<i>C. ramosum</i>	Bağırsaklarda yaygındır. Terminal konumlu sporları olup, sakkorilitk metabolizmaya sahiptirler.
<i>C.septicum</i>	İnsan ve hayvan patojenitesi ile ilişkilidir. Proteolitik ve sakkorilitk metabolizmaları vardır. Sporları terminal ya da subterminal konumda olabilirken jelatini hidrolize ederler.
<i>C. sporogenes</i>	Çok yaygın saprofitik (çürükçül) bir mikroorganizmadır. Proteolitik ve sakkorilitk metabolizmaları vardır. Sporları terminal ya da subterminal konumda olabilirken jelatini hidrolize ederler.
<i>C. thermocellum</i>	Termofilik, selüloz aktivitesi gösterir. Endüstriyel allanlarda kullanılır. Sakkorilitk metabolizmaları vardır. Sporları terminaldir.

Clostridium'ların bazı türleri üretmiş oldukları toksinler ve enzimleri ile gıda zehirlenmesine neden olmaları sebebi ile insanlar için patojeniktir. *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum* ve *C. difficile* gibi tıbbi olarak önemli patojenlerdir. Ayrıca enzim ve oluşturmuş oldukları gazlar nedeni ile gıdalarda bozulmalara sebebiyet vermektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı gıda ve insan güvenliği için *Clostridium*'lar önemlidir [41].

Clostridium'lar insanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda önemli rolleri bulunan biyolojik olarak aktif, içinde toksinlerin yer aldığı proteinler üretirler. Bu proteinler, nörotoksinler, enterotoksinler, sitotoksinler, kollegenazlar, permeanlar, nekrotizan toksinler, lipazlar, lesitinazlar, hemolizinler, proteinazlar, hyalüronidazlar, DNazlar, ADP-riboziltransferazlar, nörominidazlar ve lethal toksin olarak bilinen diğer toksinlerdir.

Çizelge 2.4. Bazı *Clostridium spp.* ve yapmış olduğu hastalıklar

<i>Clostridium spp.</i>	Yapmış olduğu hastalıklar
<i>C. perfringens</i>	Gıda zehirlenmesi, gazlı gangren, nekrotik enteritis, yara enfeksiyonları
<i>C. tetani</i>	Tetanoz
<i>C. botulinum</i>	Botulizm ve gıda zehirlenmesi
<i>C. difficile</i>	Psödomembranöz kolit ve enterokolit
<i>C. novyi</i>	Gazlı gangren
<i>C. histolyticum</i>	Gazlı gangren
<i>C. septicum</i>	Gazlı gangren

Clostridium cinsi bakteriler, gazlı gangren, tetanoz, botilismusun yanı sıra, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, besin zehirlenmesi ve psödomembranöz kolite neden olurlar. *C. tetani* sporları toprak ve çeşitli hayvanların dışkıları dahil birçok yerden izole edilirler. Tetanoz etkeni olup deride kesilme, cisim batması sonucunda meydana gelir. Nörotoksin (TeNT) diğer adı ile tetanospozmin hasarlı bölgeden hızla sinir dokusuna bağlanarak kasılmalara neden olur [40, 42].

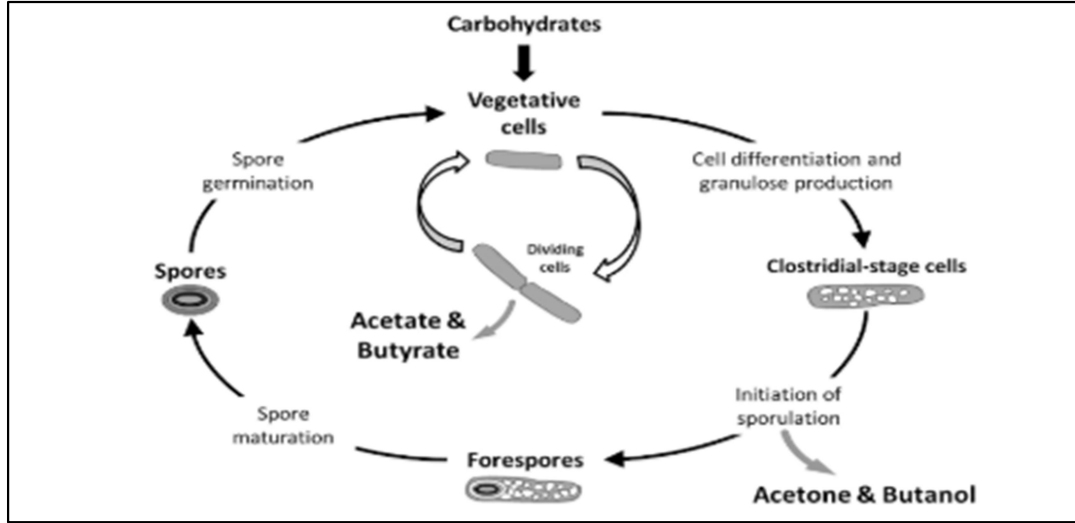
C. difficile sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında bulunan, bağırsak mikroflorasını etkileyen bir türdür. Kolit ve antibiyotik ile ilişkili ishal en önemli nedenidir. *C. difficile* enfeksiyonu klinik spektrumu, hafif ishalden toksik megakolon, ileus, bağırsak

perforasyonu ve psödomembranöz koliti içeren şiddetli intestinal hastalık tablosuna kadar oldukça değişken seyretmektedir. *C. difficile* ısı ve kuruluğa karşı dirençli spor oluşturmaya nedeni ile bu formlarda iken hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmesi bakımından önemlidir [43].

Clostridium 'lar çoğunlukla endojen mikroflora elemanları arasında olup ancak morbidite ve mortaliteye neden olan infeksiyonlara da yol açarlar. Virulans faktörleri, inokulum miktarı ve diğer özellikleri *Clostridium* türlerine bağlı hastalıkların gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Konak savunma sisteminin baskılanmış olması da *Clostridium* türleri ile gelişecek infeksiyonlara karşı hassasiyeti artırmaktadır [44].

Clostridium 'lar proteinleri, polisakkaridleri, aminoasitleri, pürinleri fermente edip ayrıştırabilmektedirler. Ayrışma ürünleri; Butirat, Butanol, Aseton, 2-Propanol, H_2 , CO_2 , N_2 'dir. Sakkaroklastik veya proteolitik metabolizmaya sahip olabilmektedirler. Karbonhidrat ve peptondan son ürün olarak genellikle asit ve alkoller oluşur.

Mikroorganizmalar içinde Aseton Bütanol Etanol (ABE) fermentasyonu yapabilen tek grup *Clostridium* 'lardır. Endüstride aseton ve bütanol üretiminde *Clostridium* 'lara ait bazı türler kullanılmaktadır. Sadece bazı *Clostridium* türleri tarafından üretilen bütanol, yüksek enerji içeriği ve düşük korozyonluk gibi özellikleri ile fosil yakıtlara alternatif olabilecek en önemli yakıtlardan olduğu için endüstride önemlidir. Bu mikroorganizmalar şekerleri, organik asitleri veya proteinleri parçalayabilmektedirler. *Clostridium* 'ların fermentasyon ürünleri isopropanol, bütirik asit, asetik asit, bütanol, aseton, etanoldür. Pentozlar ve hegzosların yanında nişasta, selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkaritleri de fermente edebilirler [45].



Şekil 2.1. Fermantasyon sırasında *C. acetobutylicum*'un farklı hücre formları ve başlıca ürünleri ile genel hücre döngüsü

Araştırmacılar anaerob bakteri olan *C. thermocellum*'un selülozu etanol ve asetik aside parçaladığını, *C. thermolyticum* (40-70 °C) türünde termofilik koşullarda selülozu etanol'e indirgeyebildiği belirtilmiş ve bu mikroorganizmaların endüstriyel olarak kullanılabileceğini önermişlerdir [130].

Silajda yaygın olarak bulunan *Clostridium* türleri üç grupta ayrılabilir. Bunlar proteolitik clostridia (grup 1), *C. butyricum* grubu (grup 2) ve *C. tyrobutyricum* (grup 3) grubu şeklindedir. Grup 1 ve 2 clostridia, genel olarak 5'in üzerinde pH'de çoğalırken, *C. tyrobutyricum* grubu daha düşük pH'larda, ancak nadiren 4,5'in altında büyüebilmektedir. *C. butyricum* grubu *C. beijerinckii* ve *C. acetobutylicum* türlerini de kapsamaktadır. *C. tyrobutyricum* gibi bakteriler karbonhidratlar ile bütirik asit ve asetik asidi fermente etmektedir.

Genelde karbonhidratları ve organik asitleri parçalayanlar sakkarolitik Clostridia, proteinleri parçalayanlar da proteolitik Clostridia olarak tanımlanır. Birinciler proteinleri, ikinciler ise karbonhidratları sınırlı düzeyde etkileyebilir. Her iki grupta yer almayan sınıf ise hem sakkarolitik hem de proteolitik etkinliğe sahip olanlardır [43].

Çizelge 2.5. Sakkarolitik, proteolitik ve diğer *Clostridium spp.*

Karbonhidratları parçalayanlar	Proteinleri parçalayanlar	Diğerleri
<i>C. butyricum</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. perfringes</i>
<i>C. paraputrificum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sphenoides</i>
<i>C. tyrobutyricum</i>		

Clostridium türleri biyokimyasal aktiviteleri temelinde farklılaştırılabilir. Çoğu tür şeker (sakaroliz) veya protein (proteoliz) moleküllerini parçalamaktadır. Bu faaliyetler, türlerin farklılaşması için saptanabilir ve kullanılabilir. Aromatik yağ asidi son ürünleri üretme kabiliyeti aynı zamanda türlerin farklılaşması için de kullanılabilir.

Diğer bütün tıbben önemli anaerobik organizmalar gibi, *Clostridium*'lar metronidazole ve clindamycine duyarlıdır. Penisilin G ve türevleri anaerop enfeksiyonlar'da sıklıkla seçilen antibiyotiktir. Ancak bu organizmaların seçici izolasyonunu arttırmak için kültür ortamına ilave edilen aminoglukozitlere dirençlidirler.

Güncel çalışmalara göre bazı *Clostridium* türleri pensiline artık büyük ölçüde dirençlilik göstermektedir. Çünkü bu bakterilerde β -laktamaz aktivitesi tespit edilmiştir. *C. clostridioforma*, *C. ramosum* ve *C. butyricum* suşları beta laktamaz yapan anaerob bakterilerdir [46].

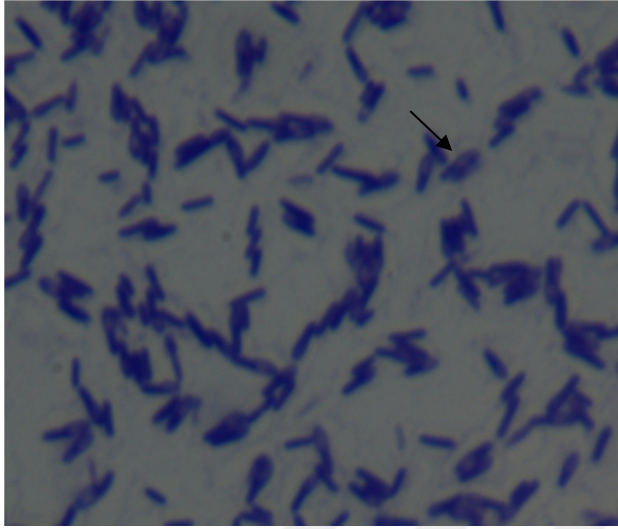
Çizelge 2.6. Bazı *Clostridium* türlerinin tedavisinde antibiyotik seçimi

Etken	İlk Seçenek	Alternatif
<i>C. perfringens</i>	Penisilin G	Klindamisin, Kloramfenikol, Metronizadol, Tetrasiklin
<i>C. tetani</i>	Penisilin G	Metronizadol, Tetrasiklin
<i>C. difficile</i>	Metronizadol	Vankomisin

2.2.1. *Clostridium sporogenes*'in genel özellikleri

C. sporogenes 3-6x0,5 μ m boyutlarında, spor oluşturabilen gram pozitif, çubuk şeklinde, flagellaları ile hareketli, zorunlu anaerob bakteridir. Hücre duvarı amino asitler ve şeker

polimeri içeren kalın bir peptidoglikan tabakadan oluşur. Sporları doğada yaygındır ve subterminal yerleşimlidir. *C. sporogenes* sporları toprak, deniz ve tatlı su, et ve süt ürünleri, dışkı, yılan zehiri gibi birçok yerde bulunur hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyona neden olur.



Resim 2.3. *C. sporogenes* ve davul tokmağı görünümde ki sporları

Anaerob ortamda 48 saatlik inkübasyon sonucunda üreyen koloniler opak, gri-beyaz renkli, düzensizdir. *C. sporogenes*, 6,0-7,6 arasında optimal bir pH aralığında iyi ürer.

Proteolitik aktivitesi değişkendir. Laktozu her zaman fermente edemezler. Lipaz aktivitesi gösterirler. Jelatin hidrolizi gösterirler. İndol negatiftir. Glukoz ve maltozu fermente edebilirken laktoz ve sükroz'u fermente edemezler. Alkol ve asit gibi uçucu metabolik ürünler oluştururlar. Başlıca ürettiği asitler asetik asit, propionik asit, bütirik asit, izovalerik asit, izopropionik asitdir.

C. sporogenes patojen değildir. Ancak karışık *Clostridium* enfeksiyonlarında ortamda bulunduklarında *C. perfringens* ve *C. septicum* gibi patojen türlerin virülansını arttırmaktadır. Bu nedenle *C. sporogenes*'in proteolitik yapısının muhtemelen insan ve hayvan enfeksiyonlarında fırsatçı patojenler için tetikleyici olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. *C. sporogenes* ve *C. botulinum* sporlarının sıcaklığa ve çeşitli dezenfektanlara karşı dirençli olması sebebiyle gıda bozulmalarına ve gıda güvenliği sorununa neden olurlar [47, 48].

2.2.2. *Clostridium beijerinckii*'nin genel özellikleri

C. beijerinckii oval, sub-terminal sporları olan sakkarolitik, tamamen anaerobik, mezofilik, hareketli, çubuk şeklinde bir bakteridir. Peritrik flagellaları ile hareketlidir. Fermantasyon sırasında *C. beijerinckii*, asetat, bütirat, laktat, hidrojen gazı, karbon dioksit, aseton, bütanol, etanol, asetoin ve asetil metil karbonil gibi bir dizi ürün üretir. Hücrenin morfolojisi organizmanın büyüme döngüsü üzerinde değişir; erken üreme fazında, hücreler uzun, lifli ve çok hareketlidir. Kültür, durağan fazda hücreler kısalır, dolgunlaşır ve daha düşük seviyede bir hareketlilik sergilerler. *C. beijerinckii* türleri doğada her yerde bulunur ve toprak örneklerinden sıklıkla izole edilir [49].

Aseton Bütanol Etanol (ABE) fermentasyonu için mikroorganizmalar özellikle sakrorolitik bütirik asit üreten *Clostridium*'lardır. *C. acetobutylicum* en popüler ve yaygın olarak uygulanmıştır.

Diğer bütanol üreten türler *C. aurantibutirum*, *C. tetanomorphum* ve *C. beijerinckii*'dir. *C. aurantibutirum* bütanole ek olarak aseton, izopropanol üretirken *C. tetanomorphum* eşit miktarda etanol ve bütanol üretir. *C. beijerinckii* ise bütanol için daha yüksek bir seçiciliğe sahiptir.

Peynirinde geç üfleme neden olan dört *Clostridium* türü vardır. Bunlar; *C. butyricum*, *C. sporogenes* ve *C. beijerinckii*, *C. tyrobutyricum*'dur [50].

2.2.3. *Clostridium bifermentans*'ın genel özellikleri

C. bifermentans, anaerobik, gram pozitif, oluşturan basildir. Doğada yaygın olup toprak, kanalizasyon, deniz tortusu ve dışkıda bulunabilirler. 'Bifermentans' adı, bu organizmanın hem karbonhidratları hem de amino asitleri fermente etme yeteneği ile ilgilidir. Bu cinsin diğer üyelerinden negatif üreaz testi ve pozitif indol ve lesitinaz testleri ile ayırt edilebilir [51].



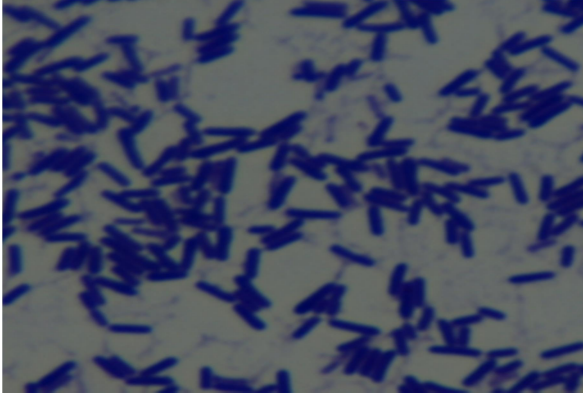
Resim 2.4. *C.bifermentans* mikroskopik görüntüsü

Başlangıçta *C. bifermentans* ve *C. sordellii* çok benzerlik gösterdiğinden *C. bifermentans*'ın patojenik olan ve olmayan türü olarak *C. sordellii* ele alınmaktaydı. %3 koyun kanlı agar'da *C. bifermentans* ürediğinde morfolojik olarak bakterinin kenarları hafif dalgalıdır. *C. sordellii* ise %3 koyun kanlı agar'da morfolojik olarak rhizoidal kenarlı ürer.

C. bifermentans'e bağlı enfeksiyonlar, bu organizmanın nispeten düşük virülansı nedeni ile ilişkilendirilmiş ve nadiren bildirilmiştir. Daha eski araştırmacılar bu bakteriyi patojenik olmayan grup olarak kabul ederken, yapılan yeni çalışmalarda bu bakterinin septik artrit, osteomyelit, yumuşak doku enfeksiyonu, abdominal enfeksiyonlar, beyin apsesi, bakteriyemi ve endokardite neden olduğunu göstermektedir [51].

2.2.4. *Clostridium sordellii*'nin genel özellikleri

C. sordellii 2-4x1 µm boyutlarında, spor oluşturan, gram pozitif, çubuk şeklinde, üreaz pozitif, anaerobik bir bakteridir. *C. sordelli* pnömoni, endokardit, artrit, peritonitit, miyonekroz, bakteriyemi ve sepsis'e neden olan patojen bir türdür.



Resim 2.5. *C.sordellii* mikroskopik görüntüsü

Bu enfeksiyonda en çok bildirilen bulgular, kadınlarda jinekolojik komplikasyonlar ile birlikte şiddetli toksik şok sendromuna neden olan bulgulardır. Bununla birlikte, *C. sordelli* enfeksiyonu vakaları erkekler ve kadınlar arasında eşit olarak kaydedilmiştir. Bu mikroorganizma insan bağırsağının %0,5'inde bulunurken topraktan da izole edilmiştir.

İki önemli virulans faktörü olan Lethal Toxin (LT) ve Hemorajik Toksin (HT), organizmanın patojenitesinde yardımcı olur. *C. sordellii*'nin bulaşma yöntemi bilinmemektedir.

2.3. Gıda Kaynaklı Hastalıkların Meydana Gelmesi

İnsan, hayvan ve bitkilerde enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara patojen mikroorganizma denmektedir. Patojenite ise konak organizmada hastalık oluşturma özelliğidir. Mikroorganizmalar, patojenitelerini virülansları ile ortaya çıkarırlar ve virülans, patojenite derecesi olarak ifade edilir. Patojen bir mikroorganizmanın virülansı, hastalık oluşturma özelliğindeki genetik, biyokimyasal ve yapısal faktörleridir [52].

Gıdaların doğal yapısında bulunabilen mikroorganizmalar ile çevreden gıdaya kontamine olan mikroorganizmalar gıdaların mikrobiyal florasını oluşturmaktadır. Mikroorganizmalardan bazıları gıda üretiminde kullanılırken, bazıları da gıdalarda bozulmaya veya gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır [5].

Patojen bir mikroorganizmanın enfektivitesi, konakçının organizmaya girme kabiliyetinden sonra yayılabilme ve çoğalabilme olmak üzere iki komponentten oluşur.

Bir enfeksiyonun oluşabilmesi için bakteriyel patojenler, konak hücrelere adezyon, dokulara kolonizasyon ve bazı durumlarda da hücrelere invazyon sonrasında hücre içi çoğalma ve bunun sonrasında diğer dokulara yayılma ya da hücre içinde kalma gibi çeşitli yolları izlemektedirler. Bakteriler, monomerik adezinler/invazinlerini ya da yüksek derecede özelleşmiş makromoleküler mekanizmaları kullanarak konak hücre ile patojen arasında iletişim sağlar. Söz konusu makromoleküler mekanizmalar, Tip III Sekresyon Sistemi ve retraktil Tip IV pilidir. Konak hücre ve patojen arasında oluşan bu iletişim, konak hücre fonksiyonlarının yıkımlanması ve hastalığın oluşmasıyla sonuçlanır.

Patojen bakteriler iki önemli mekanizma ile hastalıklara neden olurlar.

- Hücrelere invaze olma: İnvazyon, mikroorganizmaların kolonizasyon mekanizması (aderenz ve çoğalmaya başlama), konak savunma mekanizmasının aşılması ve ekstraselüler maddelerin üretilmesiyle gerçekleşir.
- Toksin oluşturma: Bakteriler ekzotoksinler ve endotoksinler olmak üzere iki tip toksin oluştururlar [52].

Kolonizasyon, mikrobiyal enfeksiyonun ilk aşaması olup, patojenlerin konakçı organizmada uygun bir yer bularak burada yerleşmesi anlamına gelmektedir. Kolonizasyonun mikrobiyal adherensi ile başlar. Adezyon, bakteri yüzeyinde bulunan adezyon proteinleri vasıtasıyla konak hücrede bulunan substratlara (reseptörler) tutunmayı sağlayan bir mekanizmadır. Mukozal yüzeye bakteriyel aderens için reseptör ve adezin etkileşimi gerekir. Nonfimbrial adezinler hücre duvarında (peptidoglikan tabakası) bulunurken fimbrial adezinler ise hücre yüzeyine daha uzakta bulunan fırça benzeri reseptörlerdir [53,54].

Epitel hücrelere bakteriyel tutunma, kolonizasyon için önemli olsa da, bununla birlikte immün hücreler tarafından gerçekleştirilen fagositozu da başlatmış olur. Pek çok patojenik bakteri polisakkaridlerden oluşan antifagositik yüzey katmanı üreterek ya da adezinlerini hücre yüzeyinden uzayan polimerik yüzeylerde oluşturarak bu durumun üstesinden gelebilmektedir [55].

İnvazyon, patojen bakteriler tarafından konak organizmanın invazyonu, vücudun savunma sistemini bozan etkiye sahip bakteriyel ekstraselüler maddelerin konak organizma

hücrelerinin ele geçirilmesi anlamına gelmektedir. İnvazinler olarak adlandırılan bu maddeler protein yapısında olup, lokal olarak konak hücrelerini etkilerler ve patojenlerin gelişmesini ve yayılmasını sağlarlar.

Bir etkenin virulansından sorumlu faktörler, onun invazivliğini veya toksijenitesini etkileyerek, onun patojenite düzeyini de etkiler. Adezinler (pilus, kapsül, tip III sekresyon sistemi, hemagglutininler, dikensi çıkıntılar) konak hücre ve dokulara tutunmayı sağlarlar. İnvazinler (fibrinolizin, hyaluronidaz, hemolizinler, Tip III sekresyon sistemi, hifal uzantılar) dokular veya hücreler içine/içinden girişe veya harekete neden olurlar. Evazinler (kapsüller, katalaz, koagulaz, M proteini, lökositinler, anti-fagozomal faktörler, immün sistem bloklayıcıları) patojeni konak savunma faktörlerinden, özellikle fagositozdan korur. Toksinler (ekzotoksinler, endotoksinler) konağın hücre veya dokularında hasar oluşmasını sağlayan herhangi bir molekülü içeren genel bir kategoridir.

Süt ve süt ürünlerinde patojen mikroorganizmaların vejetatif formlarının yok edilmesi amacı ile pastörizasyon işlemi uygulanmaktadır. Süte uygulanan yetersiz pastörizasyon veya süütün kontamine olması sonucu süt ve süt ürünlerinde patojen mikroorganizmalar bulunabilmekte bu mikroorganizmalarda gıda kaynaklı hastalıklara neden olabilmektedir.

Gıda kaynaklı hastalıklar toksinlerle kontamine olan ve patojen mikroorganizma içeren gıdaların tüketilmesi ile meydana gelmektedir. Daha çok gastrointestinal semptomlar şeklinde belirtiler gösteren klinik tablolardır. Kontamine gıdaların tüketilmesiyle meydana gelen bu hastalıklar; gıda kaynaklı infeksiyonlar ve gıda kaynaklı mikrobiyel intoksikasyonlar şeklinde ortaya çıkabilmektedir.

Gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan çok sayıda bakteri bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri ve en sık rastlanılanları *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio spp.*, *Brucella spp.* ve *Aeromonas spp.*'dir [56].

Bilinen 130 civarında *Clostridium* türü bulunmakta olup, 30 kadarı insan ve hayvanlar için patojendir. Gıda kaynaklı patojen *Clostridium* türleri *C. perfringens* ve *C. botulinum*'dur.

Clostridium'lar, doğada, toprakta, taze sular ve deniz sularında, atıklarda, omurgalı ve omurgasızların gastrointestinal sisteminde bulunurlar [5].

Bacillus cereus patojenitesi: *B. cereus*'un gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olduğu bilinmekle birlikte, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar, yeni doğanlar ve cerrahi yaraları olan hastalar arasında, fırsatçı bir patojen olarak lokal ve sistemik enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. *B. cereus* aynı zamanda kangren, sıgır mastiti, piyojenik enfeksiyonlar, selülit, bebek ölümü, septik menenjit, periodontal hastalık, akciğer apsesi ve endokardite neden olabilir. Bununla birlikte, bu enfeksiyonlar daha az yaygındır. Non gastrointestinal enfeksiyonlarla ilişkili virülans faktörleri arasında hemolizinler ve fosfolipaz C vardır. Hemolizin III, eritrosit lizisine neden olur. *B. cereus*'un çok sayıda ($>10^6$ /g) alınması ile bireylerde gıda zehirlenmesi gözlenebilir. Gıda zehirlenmesi, gastrointestinal sistemdeki bakterinin enterotoksin üretiminden kaynaklanır. Diyare sendromuna yol açan *B. cereus* sporları dozu 10^5 – 10^7 g ve emetik sendroma yol açan *B. cereus* sporları dozu 10^5 – 10^8 g alındığında gıda zehirlenmesi gözlenebilir. Diyare sendromu ile ilişkili enterotoksinler, midenin asidik koşullarına karşı dirençsizdir. Bununla birlikte, emetik sendromla ilişkili cereulide peptit toksini asidik koşullara daha dirençlidir ve 121 °C'de aktif kalır [57,31].

B. cereus gıda zehirlenmesine neden olabilecek gıdalar olarak; pişmiş pirinç, makarna, et, kümes hayvanları, sebze yemekleri, çeşitli çorbalar, pudingler, baharat ve soslar sayılabilir. Ayrıca, toprak kökenli olması nedeni ile bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabilen *B. cereus*, sporlu bir bakteri olduğu için et ve süt ürünlerinde de bulunabilir. *B. cereus* süt ve süt ürünlerinde çok yaygın termodürik süt bakterilerindendir. 63 °C'de 30 dakikalık pastörizasyonda sporları canlı kalabilmektedir. Süt kalitesini etkileyen en önemli mikroorganizma *B. cereus*'dur. Sütte çok yaygın olmasına rağmen süt ürünlerinde *B. cereus* zehirlenmesine az oranda rastlanmasının en önemli nedeni, yüksek sayıda *B. cereus* içeren süt ve süt ürünlerinde bozulmanın hissedilmesi sonucu bu ürünlerin tüketilmemesidir [60].

B. cereus toksini tripsin ve pepsin enzimlerine duyarlıdır. 37 °C'de 60 dakikada bu enzimlerin %0,01'lık dozu ile bakteri inaktif hale gelmektedir. Toksin, 45 °C'de 30 dakikada aktivitesini kaybetmez ancak 56°C'de 30 dakikada inaktif hale geçer [7].

B. cereus iki toksin üretmektedir. Bunlardan birincisi 40 kDa ağırlığındaki sıcaklığa dayanıklı bir protein olan enterotoksindir. İkincisi ise 5-7 kDa ağırlığındaki ısıya duyarlı bir peptittir. Bu toksinler gıda zehirlenmesine neden yol açarlarken, sırasıyla 126°C'de 90 dakikada ve 60°C'de birkaç dakikada tahrip olurlar [4].

B. cereus, diyare (uzun sürede gelişen diyare tipi sendrom) sendromu ve emetik (akut başlayan kusma tipi sendrom) sendrom olmak üzere toksinleri ile insanlarda iki tür gıda zehirlenmesine neden olur [31].

Diyare sendromuna neden olan virülans faktörleri, hemolizin BL (HBL), hemolitik olmayan enterotoksin (NHE) ve sitotoksin K dahil olmak üzere üç enterotoksindir [57].

Emetik sendrom genellikle pişmiş pirinç ve pirinçli gıdalarda oluşan toksinle ilişkilidir. Kusturucu toksin olarak bilinen bu toksin ısı ile pH'ın yanı sıra tripsin ve pepsin enzimlerine de dirençlidir. Diyare yapıcı toksin ise protein yapısında olup, tripsin ve pronaz enzimleri ile ısıya karşı duyarlıdır.

Nispeten daha hafif seyreden *B. cereus*'un diyare tipi (ishal tipi) gıda zehirlenmesinde inkübasyon süresi 4-16 saat arasında değişmektedir. Hastalık 12-24 saat sürerken, belirtiler ise bulantı (kusma çok seyrek), kramp şeklinde karın ağrısı ve sulu ishal şeklindedir. Genellikle ateş görülmez. *B. cereus* zehirlenmesi, *C. perfringens* gıda zehirlenmesine benzerlik gösterir. *B. cereus*'un emetik tip gıda zehirlenmesinde inkübasyon süresi 1-5 saat arasında olabilmektedir. Belirtileri arasında kusma, bulantı yer alır ve yaklaşık 24 saat belirtiler sürer.

Clostridium botulinum patojenitesi; Botulizm, *C. botulinum* tarafından üretilen nörotoksinin neden olduğu nadir, ancak yaşamı tehdit eden paralitik bir hastalıktır. Botulinum toksini nadir de olsa *C. baratii* ve *C. butyricum* tarafından da üretilmektedir. Toksinin yedi farklı tipi vardır. İnsanlarda hastalığa A, B, E ve F tipleri neden olmaktadır. *C. botulinum* nörotoksini, bilinen en kuvvetli ekzotoksindir. 1 gramı 10 milyon insanı öldürecek güçtedir. LD₅₀ değerinin 1 ng/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmiştir. *C. botulinum* intoksikasyonunun görülebilmesi için uygun koşullarda bulunan *C. botulinum*' un çoğalması, toksin üretmesi ve toksinin gıdalarla vücuda alınması gerekmektedir [58,59].

C. botulinum, ürettiği farklı serolojik yapıdaki nörotoksinlerin tiplerine göre yedi tipe ayrılırlar. Bu nörotoksinler; A, B, C, D, E, F ve G'dir. Bunlardan toprak ve yeryüzünde yaygın olarak bulunan Farklı tipler bazı konaklara özgüllük gösterir.

İnsanlarda botulizm üç şekilde ortaya çıkabilmektedir. Bunlar gıda kaynaklı botulizm, bebek botulizmi ya da yara botulizmidir. Gıda kaynaklı botilizm, botulinum toksini bulunan kontamine gıdaların alınması ile meydana gelir. Sindirim yolu ile alınan *C. botulinum* sporları intestinal sistemde germinasyona uğrar, vejetatif hücreler burada bölünerek çoğalırlar, nörotoksin oluştururlar ve kana geçer. Barsak hareketlerinin azalması, solunum güçlüğü ve yutma kabiliyeti azalması ile belirtiler ortaya çıkar [60].

Aerosol hale getirilmiş botulinum toksinin solunum yolu ile alınması sonucu ile oluşan botulizm, kontamine yiyeceklerin alınması ilede ortaya çıkar. Biyoterorizmde etkili yol gıdaların kontaminasyonu ve bu gıdaların oral yol ile alımı ile gerçekleşir. Yara botilizmi enfekte yarada *C. botulinum* üremesini takiben oluşan botulinum toksini sonucunda meydana gelir. Damar içi ilaç alışkanlığı olanlarda daha çok görülür. Ekzojen *Clostridium*'lardan kaynaklanan toksikasyondur. Bebek botilizmi en sık rastalanan botulizmlerdendir. En önemli risk faktörü toprak, toza maruz kalmak ve bal yemek olarak rapor edilmiştir. Ev içinde bulunan sporların bebek mamalarına bulaşması risk faktörü olabilir. Gıda kaynaklı botulizm, dünyadaki en yaygın botulizm biçimidir. Gıda botulizminin ortaya çıkması sürecinde; *C. botulinum* sporları gıda maddesine kontamine olmalı, sporların gelişimi, canlı kalması ve toksin üretimi için uygun koşullar sağlanmalı, gıda maddesine ısıl işlem yeterli derecede uygulanmamış olmamalıdır [60].

C. botulinum hem hayvansal hem de bitkisel gıdalarda bulunabilen bir bakteridir. Özellikle yeterli ısıl işlem görmeden yapılan ve tüketim öncesi pişirilmeden yenilen ev yapımı konserve ve et ürünleri botulizme neden olan gıdaların başında gelir. Salata olarak kullanılan ev yapımı konserve, tütülenmiş, çiğ jambon veya buharla az pişirilen balıklar, fermentasyon yolu ile lezzetlendirilmiş balıklar, ciğer ezmesi, salamura et ürünleri, çeşitli salata sosları gibi yiyecekler botulizme aracı olan gıdalardır [61].

Yapısal ve fonksiyonel bakımdan tetanoz toksinine çok benzeyen botulinum nörotoksini sinir hücrelerine girip nörotransmitter salınımını bloke eder. Ancak botulizm toksini, tetanoz toksinin aksine merkezi sinir sistemine geçmez [62].

Botulizmin her tipinde toksin periferik bölgeden (bağırsak, yara, akciğer) kan dolaşımına geçer. Motor nöronlarda kas-sinir bağlantılarına ulaşır. BoNT hücre içine girdikten sonra membranda sinir iletimini yöneten SNARE proteinin yapısını bozar. Asetilkolinin sinir uçlarından sinir-kas bağlantısına ekzosyonu engellenir ve kas aktivitesi bloke olur [63].

Besin zehirlenmesine ile ilişkili botulismusta semptomlar toksini içeren gıdaların tüketilmesinden yaklaşık 12-36 saat sonra başlar. Semptomlar toksinin tipine veya miktarına bağlı olarak 2 saat ile 10 gün arasında başlayabilir. Bulgular görme bulanıklığı, çift görme, göz kapağında düşme, ağızda kuruma, konuşma ve yutma güçlüğüdür. Yüzden başlayarak alt ekstremitelere doğru inen kaslarda paralizi (felç) gelişir. Hastanın bilinci açıktır, ateş ve duyu kaybı görülmez. Bu paralizi durumu daha sonra simetrik bir şekilde vücudun aşağı bölgelerine ilerleyerek göğüs kafesi, kol ve bacaklara yayılır. Ölüm dil veya farinks kaslarının paralizisine bağlı olarak solunum yolunun tıkanması ya da diyafram ve interkostal kasların paralizisine bağlı olarak solunum yetmezliği nedeniyle gelişir. İnfant, yara ve diğer tip botulismus durumlarında inkübasyon süresi değişkenlik gösterebilmektedir. Ancak ortaya çıkan klinik bulgular aynıdır [4, 64].

C. botulinum'un kontrolünde ise, gıda maddelerinde kontaminasyonunun önlenmesi, bakteri veya toksinin elimine edilmesi, bakterinin bulaşmasının ve toksin üretiminin engellenmesi ve şüpheli gıdaların tüketilmemesi önem taşımaktadır [65].

Clostridium perfringens patojenitesi: *C. perfringens* gıda ile alınıp, sıcaklığa dayanıklı bir enterotoksin ürettiği için enfeksiyon tipi zehirlenme olarak kabul edilir. Çiğ gıdaların, özellikle çiğ etlerin pişirilmek üzere parçalanması, doğranması ve kısılması gibi işlemler, kullanılan ekipmanların, çalışan yerlerin temiz olmaması, bu işlemlerle uğraşan kişilerin kişisel temizlik kurallarına uymamaları gibi durumlar, gıdaların bu mikroorganizma ile kirlenmesini ve mikroorganizmanın üremesini kolaylaştırır. Enfektif dozun $>10^8$ hücre olduğu bildirilmektedir [5].

C. perfringens'in neden olduğu ve hafif seyirli gıda enfeksiyonlarından, ölümcül nekrozlara kadar değişebilen hastalık tablolarının oluşumunda etkili 16 farklı virülans faktörü bulunmaktadır. Bunlardan 12 tanesi ürettiği toksinlerdir (α 'dan v'ye) diğer önemli virülans faktörleri arasında enterotoksin, hemolizin, nöraminidaz (sialidaz) ve etkenin dinamik metabolik aktivitesi yer almaktadır. Sentezlenen bu toksin tiplerine göre de etken;

A, B, C, D ve E serotiplerine ayrılmakta, Tip A ve daha az oranda Tip C insanlarda gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. Alpha, Beta, Gamma, Delta, Epsilon, Eta, Theta, İota, Kappa, Lambda, Mu, Nu olmak üzere 12 adet enterotoksini vardır [58, 66].

C. perfringens tıbbi mikrobiyolojide *C. welchii* olarak adlandırılır. A tipi toksin üreten suşları insanlarda gazlı kangrene bunun yanı sıra besin zehirlenmesi, puerperial infeksiyonlar, septisemiye C tipi toksin üreten suşlar ise nadiren *C. perfringens*'e bağlı gıda zehirlenmesi enterotoksijenik *C. perfringens*'in vejetatif halinin uygun gıdada çoğalmasını takiben gıdayla birlikte yüksek sayıda alınması, etkenlerin çoğunun mide asidinden etkilenmeden ince bağırsağa geçerek burada çoğalması, spor oluşumu ve enterotoksin açığa çıkması ile gelişir. Gıdanın tüketiminden 8-24 saat sonra akut karın ağrısı, mide bulantısı ve ishal belirtileri ile başlayan intoksikasyonda, 24-48 saat arası iyileşme görülür [61].

C. perfringens, ürettiği çeşitli toksinler ile insanlarda gazlı gangrene ve birbirinden farklı iki tip gıda infeksiyonuna neden olurken, birçok hayvan türünde 23 enterotoksemi, nekrotik enteritis gibi değişik hastalıklar meydana getirmektedir [67, 68].

Semptomlar, kontamine gıdanın tüketilmesinden 8-24 saat sonra başlamakta ve hafif seyreden infeksiyon genelde 48 saat içerisinde sonlanmaktadır. En tipik semptomlar, karın krampları ve diyare iken, nadiren ateş ve kusma görülür. Ölüm çok genç, çok yaşlı ya da hasta bireylerde görülmektedir [69, 70].

C. perfringens kaynaklı gıda infeksiyonlarının patojenitesinde gıdalara uygulanan yanlış ısıtma ve soğutma işlemleri önemli rol oynamaktadır. Gıdaların büyük porsiyonlar halinde pişirilmesi, yavaş soğutulması, uzun süre düşük sıcaklıklarda bekletilmesi ve yetersiz ısı işlemi uygulanarak yeniden servis edilmesi, etkenin vejetatif forma dönüşmesine ve çoğalmasına uygun ortam sağlamaktadır [71].

Gıdalarla alınan *C. perfringens*'in vejetatif formları, mide asidinin etkisiyle yok olmaktadır, ancak gıdadaki mikroorganizma sayısının $>10^6$ olması durumunda bazı hücreler mide pasajından canlı kurtularak ince bağırsağa geçip, burada infeksiyona neden olacak enterotoksin üretmeye başlamaktadır [72].

İnce bağırsakta enterotoksin açığa çıktığında, epitel hücrelere bağlanmakta, oluşturduğu doku hasarını takiben, sıvı ve iyon kaybı görülmektedir. Bu durum klinik olarak karın krampları ve diyare şeklinde yansımaktadır. Enterotoksinler 60 °C de 5 dakikada inaktive olduğundan, gıdalarda önceden oluşan toksinlerin enfeksiyona neden olmadığı bilinmektedir [73].

C. perfringens tip C tarafından üretilen β -toksinin neden olduğu enteritis nekrotikans, tip A kaynaklı gıda enfeksiyonuna oranla daha az görülen ancak daha ciddi seyirli bir hastalıktır. Hastalık ilk kez II. Dünya Savaşı sonrasında Almanya’da ortaya çıkmış ve “Darmbrand” olarak adlandırılmıştır. 1960’lı yıllarda Papua Yeni Gine’nin yüksek bölgelerinde yaşayan ve proteinden fakir diyetle beslenen insanlarda Pig bel olarak bilinen, endemik enteritis nekrotikans olguları görülmüştür. β -toksinin tripsin ile kolayca inaktive olması, enteritis nekrotikansın gelişmiş ülkelerde daha az görülmesinin en önemli sebeplerinden birisidir. Proteince zengin diyetlerle beslenen bireylerde, bağırsaktan salınan tripsin enzimi, toksinin etkisini ortadan kaldırmaya yeterli olmaktadır. Hastalığın patogeneğinde önemli rol oynayan bir diğer faktörde, tripsin inhibitörleridir. Tatlı patates gibi yüksek oranda tripsin inhibitörü içeren diyetlerle beraber *C. perfringens* ile kontamine gıdaların tüketilmesi hastalığın oluşmasına neden olmaktadır. Enteritis nekrotikans, *C. perfringens* ile kontamine gıdanın tüketilmesinin ardından 1-5 gün içerisinde görülen ciddi abdominal kramplar, kanlı diyare, kusma gibi semptomlarla karakterizedir. Bağırsakta şekillenen nekrotik yangının, ilerleyen aşamalarda bağırsak obstrüksiyonları ve sistemik toksemi sonucu ölümlere neden olduğu bilinmektedir. Hastalığın mortalitesi %15-25 arasında değişmektedir [74].

Gazlı gangren, ateş, belirgin ağrı, lokal ödem, miyonekroz ve enfeksiyon bölgesinde gaz oluşumuyla karakterize, hayati tehlike oluşturan, akut bir hastalıktır. Hastalığın oluşumuna neden olan önemli etkenlerden biri de *C. perfringens* Tip A’dır. Etkenin özellikle kasları etkilemesinden dolayı hastalığın bir diğer adı da ‘Clostridial miyonekroz’dur [75].

Gazlı gangren, I. Dünya Savaşı sırasında savaş alanındaki yaralı askerlerin büyük bir kısmında görülmüştür. Yine II. Dünya Savaşı gibi birçok savaş alanında da bu hastalıktan kaynaklanan ölümlere rastlanmıştır. Savaş alanları dışında hastalık, travmatik yaralanmalar veya cerrahi müdahalelerden sonra oluşmaktadır. Diyabetli hastalarda, periferik vasküler

hastalığı olan bireylerde ve gastrointestinal tümör olgularında, travma veya cerrahi müdahale olmadan da şekillendiği bildirilmiştir [76].

C. perfringens'in gazlı gangren etkeni olan A tipi bunlardan yalnızca alfa toksini yapmaktadır. Bu toksinin özelliği, kimyasal olarak fosfolipaz (Lesitinaz) C yapısında olup lesitini di gliserin ve fosforilkolin ürünlerine parçalaması, hayvanlara enjekte edildiğinde nekroz yapması, hücre membranını parçalaması ve doz arttırıldığında letal olabilmesidir [77].

Hastalığın patojenitesinde iki önemli durum söz konusudur. Bunlardan ilki, etkenin toprak veya diğer çevresel kotaminantlardan travma veya cerrahi müdahale sonucu oluşan yaradaki yumuşak dokuya ulaşması, diğeri ise yaralanan bölgelerde kan akımının bozulmasına bağlı oluşan oksijenden fakir alanların etkenin üremesi için ideal ortam oluşturmalarıdır. *C. perfringens* Tip A'nın, ürettiği α -toksin yanında perfringolizin O gibi toksinlerinin de gazlı gangren oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir [78].

C. perfringens tip A'nın insanlarda gıda kaynaklı infeksiyonlar yanında antibiyotik ilişkili diyare ve sporadik diyareye neden olduğu bilinmektedir. İlk kez 1984'de *C. difficile* toksinlerinin bulunmadığı antibiyotik ilişkili diyare vakalarından *C. perfringens*'in enterotoksijenik suşları izole edilmiştir. Yaşlılarda görülen sporadik diyare vakalarından da etkenin tespit edilmesiyle, gıda kaynaklı olmayan diyarel hastalıkların %20'sinden *C. perfringens*'in sorumlu olduğu ortaya konmuştur [79, 80].

Gıda kaynaklı olmayan diyarel hastalıklarda görülen semptomlar, gıda kaynaklı olanlara benzerlik göstermektedir ancak semptomların daha uzun süreli ve ciddi seyirli olduğu bildirilmektedir. Semptomlar, gıda infeksiyonunda olduğu gibi tipik değildir, abdominal ağrı ve diyare (bazen kanlı ve mukuslu) ile karakterizedir. Gıda kaynaklı olmayan diyare vakalarından izole edilen suşların plazmidal cpe geni taşıdığı da tespit edilmiştir [81].

C. perfringens'in farklı tipleri, insanlar dışında birçok hayvan türünde de değişik hastalıklar meydana getirmektedir [82].

C. perfringens'in kontrolünde ısıtma işlem sonrasında bulaşmanın engellenmesi için sanitasyon kurallarına uyulması, gıdaların hızla soğutulması buzdolabında saklanması,

tekrar ısıtma yapılacağı zaman vejetatif bakterinin ölmesini sağlayacak 60 °C'nin üzerinde ısıtma işlem uygulanması önerilir [61].

2.4. *Bacillus spp.* ve *Clostridium spp.* Antimikrobiyal Direnci

B. cereus ve *B. thuringiensis* geniş spektrumlu beta laktamaz üretirler. Bu nedenle penisilin, ampisilin ve sefalosporinlere dirençlidirler. Aynı zamanda trimethoprim de dirençlidirler. Kan kültürlerinden izole edilen 54 suşu kapsayan bir çalışmada tüm suşları imipemen ve vankomisine duyarlı, %22-37'si klindemisin ve tetrasikline orta duyarlı, pek çoğunda kloramfenikol, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin'e duyarlı olduğu gösterilmiştir. Suşların klindemisin, eritromisin, kloramfenikol, vankomisin ve aminoglukozitlere her zaman duyarlı olmaları tetrasiklin ve sülfonamidlere genellikle duyarlı olmalarına rağmen bu ilaçlarla her zaman tedavi başarılı sonuçlar vermediği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda gentamisin *B. licheniformis*'in neden olduğu oftalmit vakasında; sefalosporin *B. licheniformis*'in neden olduğu bakteriyemilerde etkili bulunurken makrolidlere doğal olarak dirençli bulunmuşlardır.

Yapılan bir araştırmada ise *B. polymyxa* ve *B. circulans* suşlarının penisilin ve sefalosporinlere diğer türlerin suşlarından daha dirençli oldukları tespit edilmiştir.

C. ramosum, *C. clostridioforme* ve *C. butyricum* izolatlarında penisilin direnci yaygındır. Bu türler beta laktamaz enzimi üretirler Beta laktam antibiyotikler klindamisin ve metronidazol'e dirençlidir. *C. perfringens* dışında pek çok *Clostridium* sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim, sefoperazon ve geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklere dirençlidirler [83].

2.5. Biyofilm ve Gıda Endüstrisinde Önemi

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Bu yapı içinde bakteriler tipik olarak polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitlerden oluşan bir hücre dışı matrise yapışık olarak bulunurlar. Bu ekzopolimerik maddeler genellikle bakterileri çevreler ve

korurlar. Böylece biyofilm bakterilerin, çeşitli antimikrobiyallere karşı daha dirençli olmasını sağlar [84, 85, 86].

Biyofilmlerin, antimikrobiyal ajanlara dirençlilik göstermeleri sürekli enfeksiyon kaynağı olabilmeleri, diğer patojen mikroorganizmaları barındırmaları ve direnç plazmidlerinin karşılıklı olarak geçişine yol açmaları nedeniyle oldukça önemlidirler. Bakterilerin biyofilm yapması olumsuz koşullarda hayatta kalmasına direnç sağlamasına yardımcı olurken, patojenitesi üzerine de etkilidir.

Biyofilmler, gıdaların bozulmasına, raf ömrünün azalmasına neden olan mikroorganizmalar ve patojen mikroorganizmaların gıdalara kontaminasyonu için kaynak oluşturabilir. Birçok bakteri süt endüstrisi ekipmanları üzerine slime tabaka oluşturarak yapışabilmekte, daha sonra bu yüzeylerde biyofilm oluşturabilmekte ve gıdaları kontamine edebilmektedir. Biyofilm oluşumu, gıda zehirlenmesine ve ekipman bozulmasına neden olduğundan dolayı ciddi hijyen sorunlarına ve ekonomik kayıplara yol açabilmektedir [87].

Bazı bakteriler biyofilm oluşturmak için yüksek eğilime sahiptirler. *Bacillus*'lar da bunlar arasında yer almaktadırlar. Besin maddelerinin çok olduğu birçok ekosistemde tüm yüzey tipleri üzerinde biyofilm oluşturabilmektedirler. Özellikle *Bacillus* cinsinin üyeleri tarafından oluşturulan biyofilmler kontaminasyonda etkilidir [62, 88].

Bacillus'lar işletme ekipmanlarının'da ısı değiştiricilere tutunmuş halde, pastörizatörlerin giriş ve çıkış kısımlarında biyofilm oluşumu gösterebilmektedirler. Süte uygulanan pastörizasyon işlemi ile çoğu zaman ortamdaki sporlar yok olmamakla birlikte sadece vejatatif hücreler öldürülür. Yine temizleme işlemleride *B. cereus* sporları üzerine etkili değildir ve bu sporlar paslanmaz çelik yüzeyler üzerine tutunmaya devam ederler. Bu durum; *Bacillus* sporlarının sütte çeşitli işlemler sonrasında da bulunduğunu ve süt veya süt ürünlerinin oda sıcaklığında muhafaza edilmesi durumunda spor oluşturabileceğini göstermektedir [67].

Clostridium türleri sindirim sisteminde bulunabileceğinden biyofilm oluşturan *Clostridium*'lara özellikle bağırsak mikroflorasın da rastlanır. Bununla birlikte, insan bağırsağında, gözlenen bakteri tabakasının bir biyofilm olup olmadığı tam olarak

belirlenmemiştir. Bazı çalışmalar biyofilmin insan bağırsağında oluştuğunu düşündürmektedir. Örneğin; Swidsinski ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada enflamatuvar barsak hastalığı olan hastalarda biyofilmin mevcut olduğunu, biyofilmlerin ise sağlıklı hastalarda nadir olarak bulunduğu gösterilmiştir [89].

Ayrıca ülseratif kolitli hastalarda mukozal topluluklarında ki mikrobiyota sağlıklı hastalardan farklıdır. Ülseratif kolitli hastalarda *C. butyricum* ve *C. clostridioforme* sağlıklı hastalara göre az iken, *C. perfringens* iki grupta da benzer miktarda bulunur [90].

Birçok biyofilm de *C. perfringens*'e bağlı biyofilm oluşumuna rastanmaktadır. Enfeksiyonlar sırasında bağırsak dışında biyofilm oluşturan diğer *Clostridium* türleri de gözlenmiştir. *C. bifermentans* ve *C. sordellii* dahil olmak üzere 6 tür *Clostridium* enfeksiyona katkıda bulunmuş ve biyofilm oluşturmıştır. *C. perfringens*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. fallax* ve *C. difficile* gibi türler eksplante biliary stentlerden izole edilmiştir [91, 92].

Yeni bir *Clostridium* türünün, insan dışkısında nişasta üzerinde tutturulduğu, nişasta çevresinde rozet gibi bir yapı ve daha sonra da bir biyofilm oluşturduğu keşfedilmiştir. Bu yeni *Clostridium* tür, özellikleri bakımından selülitik bakteri olan *C. chartatabidum*'a yakındır. Diğer bakterilerden izole edilmesi zordur ve bu durum dirençli nişastadaki çok özellikli biyofilm oluşumuna bağlı olabilir. Bağırsaktaki biyofilmler, bağırsağın epitelyum yüzeyine yakın lokalize olan mukus tabakasında veya bağırsak lümeninde bulunan besinler üzerinde bulunabilir [93].

İnflamatuvar barsak hastalığı olan hastalarda biyofilm varlığını gösterirken, biyofilmler sadece sağlıklı hastalarda sporadik olarak bulunmuştur [89].

Patojenik *Clostridium* türlerinden *C. difficile*, *C. botulinum* ve *C. perfringens*, patojenik olmayan *Clostridium* türlerinden ise *C. clostridioforme*, *C. malenominatum*'un sıklıkla biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir [94].

2.6. Süt ve Süt Ürünlerinde *Bacillus* ve *Clostridium* Türlerinin Yapmış Olduğu Bozulmalar

Süt ürünlerinin kalitesi, hammadde olarak kullanılan çiğ sütün kalitesi ile doğru orantılıdır. İşlenecek çiğ sütün fiziksel, kimyasal ve duyu kalitesinin yanında biyolojik kalitesi de önemli bir faktördür. Çiğ süt az miktarda bakteri içerse bile pek çok mikroorganizmanın faaliyeti için uygun bir gıda olması nedeniyle kontaminasyona açıktır. Kontaminasyon sağım sırasında ya da sağımdan sonra hava, toz, toprak, su, silaj, kullanılan kap ve sağımda kullanılan makine gibi çeşitli yollarla olabilmektedir [124, 125].

Yapılan araştırmalar sonucunda, pastörizasyon işlemi ile sütte bulunan patojenlerin tamamı, patojen olmayanların da %99'u yok edilmektedir. Çiğ sütün kaynatılması ile içerdiği patojen bakterilerle birlikte sütte ki sporlu bakteriler dışındaki tüm mikroorganizmalar öldürülmektedir. UHT (Ultra High Temperature) işlemiyle de patojen olmayan, ısıya dayanıklı bakteri sporları dışındaki tüm mikroorganizmaların öldüğü belirtilmiştir [20].

Süt ürünlerinde rastlanıp en yaygın spor oluşturan bakteriler *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait olup, süt ürünlerinde bozulma ve halk sağlığını tehdit edip patojenik olması sebebi ile önemlidir. Spor oluşturan bakteriler süt endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olması ve gıda kaynaklı hastalıklara sebebiyet vermesi nedeni ile önemlidirler. Süt bileşenlerinin çeşitli enzimatik aktivitelerle bozulması, işlenmiş sütün raf ömrünü azaltabilir. Örneğin, proteazlar tarafından kazein sindirimi, acı tat oluşumu ve sütün pıhtılaşması ve jelleşmesine yol açabilir. Lipazlar, serbest yağ asitleri elde etmek için tributrini ve diğer süt yağı gliseridlerini hidrolize ederler, bu da sütün tadı acı, kirli ve sabunlu olmasına neden olur. Lesitinazlar, süt yağı globule membran fosfolipitlerini bozar ve süt yağının lipazların etkisine olan duyarlılığını artırır [95, 96, 97].

Patojenik olmayan *Clostridium* türleri de süt ürünlerinde yapı kusurlarına ve bozulmalara neden olduğundan ürünün kalitesini belirlediği için ekonomik olarak önemlidir. *Clostridium* türleri toprak, su, toz, hayvan ve insan dışkı, yemlerde, özellikle kötü kalite silo yemlerinde, taze yeşil otlarda ve bunlardan hazırlanan kuru otlarda bulunup bunlar aracılığı ile sporlu olmalarından dolayı sağım sırasında ve çeşitli yollarla süte kontamine olabilmektedirler. Süt ürünlerinde anaerobik floranın %75'ini *C. sporogenes*,

C. perfiringens, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* oluşturur. Peynir, krem peynir, süt tozu, yoğurt ve dondurmada *Clostridium* türlerine rastlanılmıştır.

Peynir; sütün peynir mayası ile veya ekşitilerek pıhtılaştırılmasından sonra serumun ayrılması sonucu hazırlanan telemenin bazı işlemlerden sonra olgunlaştırılmasıyla elde edilen süt ürünüdür. Peynirin üretiminde ve olgunlaştırılmasında bazı mikroorganizma gruplarının önemli aynı zamanda da yararlı etkileri vardır. Dünyadaki peynir çeşitleri arasındaki farklılık, yapım sırasında uygulanan işlemde ve olgunlaşma sırasında rol oynayan mikroorganizma türlerinin çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Peynir üretiminde, çiğ, hafif ısıtılmış işlem görmüş veya pastörize sütler kullanılabilir. Çiğ sütlerde patojen mikroorganizmalar ve saprofit mikroorganizmalar (peynirde yapı ve lezzet kusurlarına neden olan) bulunabileceğinden peynir çiğ süttten yapılmamalıdır. Ancak çiğ süttten yapılan peynirler daha çabuk olgunlaşır. Bu nedenle peynir üretiminde düşük ısıtılmış işlem (64-72 °C ta 15-20 sn) görmüş sütler kullanılmalıdır. Üretimde çiğ süt kullanımı, yetersiz ısıtılmış işlem uygulaması, üretim sırasında veya sonrasında meydana gelen bulaşmalar nedeniyle peynirde bulunan patojen mikroorganizmalar önemlidir [98, 99].

Peynir kaynaklı hastalıklara *S. aureus*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Brucella spp.* gibi mikroorganizmaları içeren çeşitli Gram-pozitif veya Gram-negatif bakteriler sebep olmaktadır. Isıtılmış işlem görmüş ve vegetatif mikroorganizmaların yok edildiği sütlerde *Clostridium* türleri bütirik asit fermentasyonuna neden olarak bütirik asit, H₂ ve CO₂ oluştururlar. Gaz oluşumu genellikle asit fermentasyonunu takip eder ve genellikle süt ve ürünlerinde oluşumu istenmeyen bir olaydır. Gaz oluşumu sütte köpüklenme pıhtıda ise pıhtının parçalanması ve yarılması ile belli olur. Gaz oluşumu 0-37 °C arasında meydana gelir. Koliform bakterileri, *Bacillus* ve *Clostridium* türleri, propiyonik asit türleri, başlıca gaz oluşturan mikroorganizmalardır.

Parmesan, grana padano, emmental, gravyer, gouda ve provolone gibi peynirlerde olgunlaşma sırasında *Clostridium* türleri gelişir. Peynirlerde gaz üreten ve şişmeye neden olan başlıca *Clostridium* türleri, *C. sporogenes*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* ve *C. beijerinckii*'dir. Söz konusu durum peynir yapımından birkaç hafta sonra ortaya çıktığı için bu bakterilerin neden oldukları şişme geç şişme olarak tanımlanır. *Clostridium*'un bazı türleri laktik asidi propiyonik asit yerine bütirik asit, karbondioksit ve hidrojene fermente edip peynirlerde geç şişmeye neden olur. Anaerobik koşullarda gelişen bu bakteriler

peynirdeki oksijenin diğer bakteriler tarafından tüketilmesinden sonra etkinlik göstererek gaz üretirler ve iri gözeneklerin, çatlak ve yarıkların oluşmasına, ardından şişmelere yol açarlar. Genellikle sert ve yarı sert tip peynirlerde görülen bu kusura yumuşak tip peynirlerde pek rastlanmaz. Geç şişme peynirin belli bir bölümünde olabileceği gibi, peynirin tamamında da gözenekli bir görünüm meydana getirebilir [41].

Üretmiş oldukları bütirik asit ve uçucu yağ asitleri ile kötü koku ve tatlara yol açan bileşikler oluştururlar. Bütirik asit miktarının 200 µg/L veya daha fazla olduğu durumlarda lezzet hataları hissedilebilir düzeyde olmaktadır. Bu hatanın oluşması için çok fazla anaerobik spora gerek yoktur. 200-300 spor/mL veya daha az spor içeren sütte de bu hataya rastlanabilmektedir [13, 100].

C. tyrobutyricum süte silajdan ya da fekal kaynaklardan bulaşmaktadır. Laktik asidi fermente eden, spor oluşturan *Clostridium*'lar düzgün bir şekilde fermente edilmemiş silajda çok yüksek düzeylerde (>100 000 spor/g) bulunmaktadır. Bu hatayı önlemek için pıhtı düzenli bir şekilde oluşturulup, su içeriği, pH ve tuz seviyesi optimum tutulmalıdır. Yine süte sodyum ya da potasyum nitrat da katılabilmektedir [13].

Bacillus, *Clostridium* gibi spor oluşturan termofilik bakterin çiğ sütlerde bulunma oranı mevsime bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sıcak iklimlerde *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakteriler kış aylarında toplanmış sütlerde yaza göre daha yüksek oranlarda bulunmaktadır. Bunun nedeni olarak da kış aylarında ineklerin sporla kontamine olmuş yataklarda yatması ve besinleri yemeleri gösterilmiştir. Yaz sütlerinde, taze ot ile beslemeye bağlı olarak, *C. sporogenes* ve *C. butyricum* dominanttır. Kış sütlerinde ise *C. tyrobutyricum* floraya egemendir [101].



Resim 2.6. *Clostridium* gelişimi görülen peynir örnekleri [129]

Sütün spor oluşturan kirleticileri arasında *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus* türleri önemli yer tutar. *Bacillus* 'lar proteolitik, lipolitik, fosfolipaz ve beta-laktamaz enzimlerinin etkisiyle, süt ve süt ürünlerinin kalitesini etkilemektedirler [7, 41].

Bazen peynirlerin iç kısımlarında, başlangıçta küçük boyutlarda çürük bölgeler oluşur. Bu çürükler tek tük ya da çok sayıda olabilir ve zamanla büyürler. Hatta bazen çapı 10-15 cm olan boşluklar ortaya çıkar. Söz konusu çürükler beyaz veya gri renklidir. Bunların içleri yapışkan kremi ve pis kokan kalıntılarla kaplanır. Çoğu kez emmental tipi peynirlerde görülür. Gri çürükler grevyer peynirinde bulunurlar, nadiren de emmental peynirinde de oluşurlar. Çok miktarda çürük içeren peynirler yenilmezler. Beyaz renkli çürükleri olanlar zehirleyici etki gösterebilirler. *C. sporogenes* ve *B. putrificus*, beyaz renkli çürüklerin oluşmasına neden olurlar.

Proteinlerin hidrolizi sonucu bazı peptitler (Proteoliz) oluşur. Bu durumda sütün tadını acılaştırır. Isıl işlemle asit oluşturan bakterilerin yok edilmesi, ortamdaki asidin mikroorganizmaların diğer ürünleriyle nötrleştirilmesi ve sütün düşük sıcaklıkta saklanması, proteolizi hızlandırır.

Pseudomonas, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Mikrococcus*, *Bacillus* ve *Clostridium* türleri, *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotricum*, *Rizopus* küfleri süt yağında proteoliz etmenidir Süt yağı çeşitli bakteri, maya ve küfler tarafından parçalanıp tadı ekşi veya asit, acı, yanık veya karamel, sabun, malt tadı şeklinde bozulabilir. Süt yağındaki değişiklikler oksidasyon,

hidroliz veya her iki olayın birlikte oluşmasıyla oluşur. Oksidasyonda okside edici bakteriler, hidroliz olayında lipolitik mikroorganizmalar rol oynar.

B. subtilis, peynirlerin olgunlaşması sırasında asit yıkımı gerçekleştikten sonra gelişerek acı maddeler oluştururlar. Bunun yanı sıra çiğ ve pastörize sütlerde sünmeye, bulanıklığa ve tatlı pıhtılaşmaya neden olur.

Süt şekerinin heterofermantatif olarak parçalanması, peynir yapımı sırasında veya peynir yapımından kısa bir süre sonra meydana gelmektedir. Bu nedenle bakterilerin oluşturduğu bu tip şişmeye erken şişme denir. *B. cereus* tarafından oluşturulan mikrobiyel proteaz ve lipazlar acı maddelerin oluşumunda etkilidir. *B. cereus* fosfolipaz C enzimi ile pastörize sütlerde ‘bitty cream’ yani ‘parçalı krema’ adlı bozulmaya neden olmaktadır [102].

Termodurik *Bacillus* türlerinin bazıları ısıya dayanıklı sporları ile pastörize sütlerde hoşagitmeyen tad oluşumuna neden olurlar. Bu lezzet kusurları oluşumunun şiddeti süt proteinlerinin ve yağlarının mikrobiyal enzimlerle parçalanma düzeyine bağlıdır [8].

Clostridium, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Proteus* cinslerine giren türlerin çoğu proteolitikdir. Bazı bakteriler asit-proteolitik olup, hem asit oluştururlar hem de proteinaz enzimi ile proteinleri parçalarlar. Bazı bakteriler putrefaktif olup, proteinleri anaerob şartlarda parçalayarak kötü kokan H₂S, merkaptanlar, aminler, indol ve yağ asitlerine parçalarlar. *Clostridium* cinsinin proteolitik türlerinin çoğu putrefaktiftir. *B. subtilis* ve *C. butyricum* amilolitikdir. Süt proteinin hidrolizi sonucu bazı peptidler sütte acı bir lezzet oluşturur. Ayrıca lipolitik aktivite ve laktoz fermentasyonu sonucunda da acı lezzet oluşabilir.

Pastörize sütlerde bulunan *B. cereus* tatlı pıhtılaşmaya, parçalı krema ve tat kayıplarına neden olmaktadır. Ayrıca *B. cereus*’un gıda kaynaklı patojen bir bakteri olması sebebi ile gıda zehirlenmelerine yol açabilmektedir. Bu nedenle de süt endüstrisinde önemlidir [103].

Psikrotrof bakteriler bakteriyal lipaz enzim aktivitesi sonucu süt yağının hidrolizi ile serbest yağ asitleri açığa çıkarırlar. Bunun sonucunda gıdalarda acı tat, sabunumsuluk gibi istenmeyen değişikliklere sebep olmaktadır. Lipolitik lezzet kusurları özellikle krema,

tereyağı, peynir ve UHT sütlerde gözlenmektedir. Lesitinaz ve diğer fosfolipazlar psikrotrof bakterilerin önemli lipaz gruplarıdır. [104].

Dondurma süt, şeker, stabilizatör madde, aroma ve renk verici çeşitli maddelerin katılmasıyla hazırlanan karışımın pastörize edildikten sonra dondurulmasıyla elde edilen sevilerek tüketilen süt ürünüdür. Dondurma yapımında pastörizasyon sıcaklıkları minimumda tutulsa dahi termofilik mikroorganizmalarla, anaerob ve aerob bakteri sporları canlı kalabilir. Ayrıca hijyenik olmayan meyveler, aroma maddeleri ve diğer katkı maddeleri mikrobiyal kontaminasyona neden olabilmektedir. Yeterli dezenfekte edilmemiş ekipmanlar ve ambalaj kapları da kontaminasyon kaynağıdır. Dondurma işlemi sırasında mikrobiyal gelişme durur fakat mikroorganizmalar canlı kalırlar. Dondurma üretiminde mikrobiyal bozulmaları önlemek için; yeterli pastörizasyon yapılmalı, dondurma işlemi kısa sürede yapılmalı, iyi bakteriyolojik nitelikte katkı maddeleri kullanılmalı, tüketim aşamasına kadar soğuk zincirde bir aksama olmamalıdır [105].

Düşük kalitedeki çiğ süttten elde edilen dondurmadaki yetersiz pastörizasyon işlemi sütte bazı mikroorganizmaların çoğalmasına neden olur. Nitekim yapılan çalışmalarda dondurmalarda değişen oranlarda *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojen mikroorganizmalara rastlanmış ve dondurma kaynaklı mikrobiyel gıda zehirlenmeleri bildirilmiştir [104].

Çiğ süt, peynir ve dondurmalarda *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin bulunmasının nedenleri arasında silaj yemlerinin kullanılması, çiğ süt kalitesinin yetersizliği, işletme ve üretim yerlerinde hijyen eksikliği, yetersiz pastörizasyon yer almaktadır. Bu bakterilerin süt ürünlerinde önlenmesi silaj yemlerinin kullanılmaması, hijyen kalitesi iyi olan sütlerin kullanımı, süttün baktöfugasyon veya mikrofiltrasyonu, nisin veya bakteriyosin üreten starter kültür kullanımı, süte nitrat ya da lizozim eklenmesi, yeterli pastörizasyon ve hijyen koşullarına uyulması ile olur [106, 107].

3. MATERİYAL VE METOD

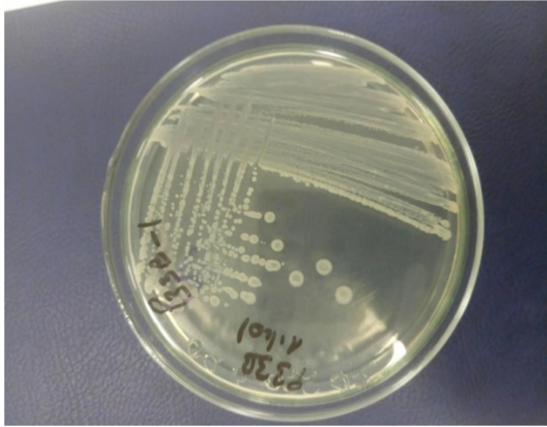
Araştırmamızda 06.07.2015-04.05.2017 tarihleri arasında Ankara’da bir süt fabrikasından alınan çiğ süt (40) ile pazar ve market gibi çeşitli yerlerden alınan peynir (40), dondurma (20) örneği materyal olarak kullanılmıştır. Araştırma sonucunda izole edilen *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerinin tür düzeyinde tanımlanmasında Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ve Manual of Clinical Microbiology'de (2011) belirtilen biyokimyasal testler esas alınmıştır. Ayrıca Becton Dickinson (BD) BBL Crystal Identification Systems Gram-Pozitif ID kit ile *Bacillus* türlerinin, 16S rRNA (Refgen) tanımlama sistemi kullanılarak ise *Clostridium* türlerinin doğrulaması yapılmıştır. Toplanan örnekler tat, koku değişimine neden olmayacak ve mikrobiyal yükünü etkilemeyecek şekilde soğuk zincir takip edilerek steril şartlarda laboratuvara getirilmiştir. Örnekler analiz edilinceye kadar buzdolabında saklanmış ve aynı gün içerisinde çalışılmıştır.

3.1. *Bacillus spp.*'nin İzolasyonu

Bacillus türlerinin izolasyonu amacı ile çiğ süt örneklerinden 5 ml, peynir ve dondurma örneklerinden 5 gr tartılarak 45 ml tamponlanmış Peptone Water’a örnekler aktarılmıştır. Toplanan örneklerde bulunabilecek mikroorganizmaların vejetatif formlarını yok etmek amacı ile 80 °C’de 15 dakika pastörizasyon işlemi yapılmıştır.

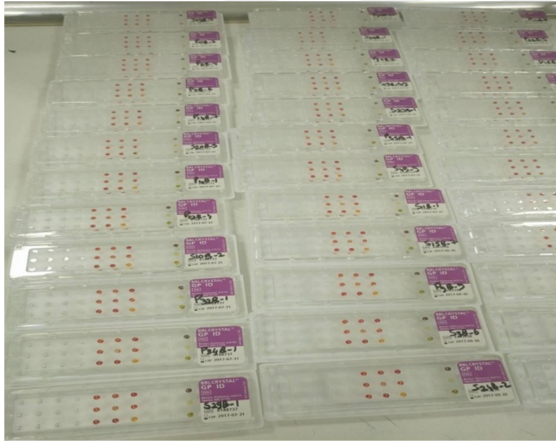
Ön zenginleştirme amacıyla Peptone Water’a ekimi yapılan örneklerden bir öze dolusu alınarak Nutrient Agar'a yayma ekimi yapılarak 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu besiyerinde üreyen şüpheli *Bacillus* kolonileri Gram boyama ile boyanarak mikroskopta sporlu basil olup olmadıkları kontrol edilmiştir. *Bacillus* şüpheli kolonilerini cins düzeyinde tanımlamak için biyokimyasal testler yapılmıştır. Katalazı pozitif, indolü negatif olan suşlara karbonhidrat fermentasyon testi uygulanmıştır.

Katalaz reaksiyonu, indol teşekkülü, sitrat, triple sugar iron (TSI), üre, voges proskauer (VP) testlerinden sonra *Bacillus* suşlarının çeşitli şekerleri kullanma yeteneklerini test etmek amacıyla fermentasyon testleri kullanılmıştır. Kullanılan şekerler glukoz, laktoz, sükroz ve maltoz’dur. Ayrıca ksiloz ve mannitol testleride uygulanmıştır. Bu amaçla temel karbonhidrat besiyeri olarak Purple Broth Base kullanılmıştır.



Resim 3.1. Nutrient Agar'da üremiş *Bacillus spp.*

Araştırmada manuel testler yanında suşların doğrulanması için BBL Crystal Identification System Gram-Positive ID Kit kullanılmıştır.



Resim 3.2. Bakteri süspansiyonu içeren BBL Crystal GP ID Panelleri

3.2. *Bacillus spp.*'nin İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Alkali Peptonlu Su (APS)

Bileşimi:	g/l
Pepton	10
Sodyum klorür	5,0
Potasyum nitrat (KNO_3)	1,0
Sodyum karbonat ($NaCO_3$)	2,0
pH	8,6

Besiyerinden erlenlere 45 ml dağıtılıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir. +4 °C'de muhafaza edilir.

Nutrient Agar

Bileşimi:	g/l
Tryptone	5
Yeast extract	2,5
Glucose	1
Agar	5
Distile su	1

pH 7,0 ± 0,2 ayarlanıp 121 °C'de 15 dakika steril edilip, 50 °C'ye soğutulduktan sonra iyice karıştırılarak steril petriye dökülür.

3.3. *Clostridium spp.*'nin İzolasyonu

Clostridium türlerinin izolasyonu amacı ile çiğ süt örneklerinden 5 ml, peynir ve dondurma örneklerinden 5 gr tartılarak 45 ml tamponlanmış Bryant and Burkey Broth (BBB) çoğaltma ortamına örnekler aktarılmıştır. Mikroorganizmaların vejetatif formlarını yok etmek amacı ile 80 °C 'de 15 dk pastörizasyon işlemi yapılmıştır. Ön zenginleştirilmesi yapılan örneklerden 9 ml Bryant and Burkey Broth (BBB) içeren tüplere 1000 µl olacak şekilde aktararak içinde anaerobik kit bulunan anaerobik jar'da 37 °C de 24 ila 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda sıvı besi yerinden 0,1 ml örnek alınarak Kanlı Agar ve Reinforced Clostridial Agar (RCA) gibi katı besi yerlerine yayma ekim yöntemi ile pasajlaması yapılmıştır. Bu besiyerlerinde anaerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *Clostridium* 'lar kanlı agar'da grimsi, nemli ve beta hemolitik koloniler oluşturur. RCA'da ise siyah renkte koloni oluşturanlar şüpheli *Clostridium* kolonisi olarak değerlendirilir. Üreyen şüpheli kolonilerden saflaştırmak için aynı besiyerlerine tek koloni ekim yapılmıştır.

Kanlı Agar ve Reinforced Clostridial Agar (RCA) besiyerlerinde üreyen bu kolonilerden önce Gram boyama ile boyanarak mikroskopta sporlu basil olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Ayrıca spor boyamaları yapılmıştır. Şüpheli kolonileri cins düzeyinde

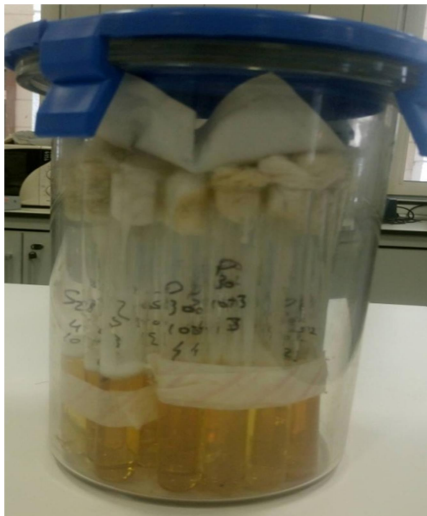
tanımlamak için katalaz ve üreaz testleri yapılmıştır. Katalaz ve üreaz'ları da negatif olan suş'lar *Clostridium* olma ihtimali dikkate alınarak diğer biyokimyasal testleri yapılmıştır ve tür düzeyinde tanımlanmıştır. Tanımlanması yapılan bakterilerin doğrulaması için 16s rRNA mikrobiyal tanımlama sistemi ile yapılmıştır.

3.4. *Clostridium spp.*'nin İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Bryand and burkey medium

Bileşimi:	g/l
Casein peptone	15,0
Yeast extract	5,0
Meat extract	7,5
Sodium acetate	5,0
Cysteine hydrochloride	0,5
Resazurin	0,0025
Calcium lactate	5,0

Dehidre besiyeri 38 g/L olacak şekilde distile su içinde gerekirse ısıtılarak eritilir, tüplere ya da erlenlere dağıtılıp 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir.



Resim 3.3. Anaerob koşullarda Bryand and burkey medium'da üreyen *Clostridium* izolatları

Reinforced Clostridial Agar (RCA)

Bileşimi:	g/l
Yeast extract	13,0
Peptone	10,0
Glucose	5,0
Soluble starch	1,0
Sodium chloride	5,0
Sodium acetate	3,0
Cysteine hydrochloride	0,5
Agar	12,5

pH 6.8 ± 0.2 ayarlanıp dehidre besiyeri 50 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C 'da 15 dakika süre ile sterilize edilip petrilere dökülür.



Resim 3.4. Reinforced Clostridial Agar 'da üremiş *Clostridium* suşu

Blood Agar Base

Bileşimi:	g/l
Beef heart peptone	10
Tryptose	10
Sodium chloride	5
Agar	15

pH 7.3 ± 0.2 ayarlanıp besiyeri 121 °C'de 15 dakika süre sterilize edilip petrilere dökülür.

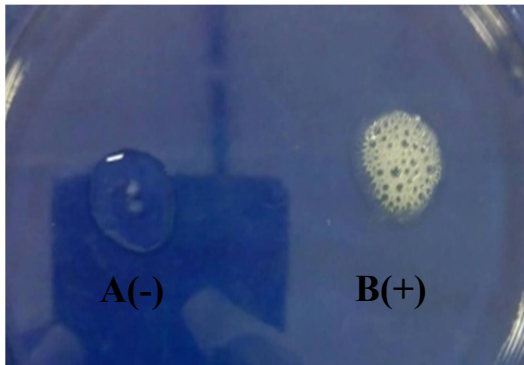
3.5. İdentifikasyonda Kullanılan Besiyerleri, İçerikleri ve Testlerin Yapılışı

3.5.1. Gram boyama

Temiz bir lam üzerine bir damla distile su ile karıştırılarak lam yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılarak ve havada kurutulmuştur. Kuruyan lam alevden birkaç kez geçirilerek hücreler tespit edilmiştir. Lamın üzerine kristal-violet dökülüp 1 dakika sonra distile su ile tüm yüzey yıkanmıştır. Yıkanan lamın üzerine lugol dökülerek 1 dakika beklenmiş, distile su ile hafifçe yıkanmış ardından % 95'lik alkol ile kısa süre (15 sn.) muamele edilerek distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan lamın üzerine safranin dökülerek 30 sn. beklenip distile su ile yıkanarak kurutulmuştur. Boyanan preparat mikroskopta incelenmiştir.

3.5.2. Katalaz testi

Aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların sahip olduğu katalaz enzimi, ortamdaki hidrojen peroksidi su ve oksijene ayrıştırır. Sıvı veya katı besiyerinde geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu mikroorganizma alınıp üzerine H_2O_2 ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları şeklinde gözlenmesi, hidrojen peroksidin ayrışmasını dolayısıyla katalaz enziminin varlığını gösterir. Testin yapılışı; lam üzerine izole edilen saf suşlardan bir öze dolusu alınarak, üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılarak karıştırılmış ve gaz kabarcıklarının olup olmadığı gözlemlenmiştir. Lam üzerinde gaz kabarcıklarının oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.5. Katalaz testi; A: Katalaz negatif; B: Katalaz pozitif

3.5.3. Üreaz testi

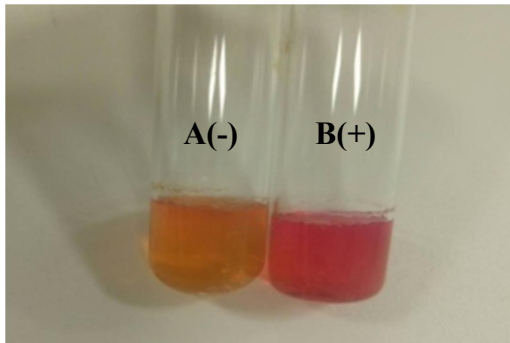
Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden üreaz enzimi üretimini saptamak amacıyla uygulanmaktadır.

Urea Agar Base (Christensen) (Oxoid CM0053)

Bileşimi:	g/l
Peptone	1,0
Glucose	1,0
Sodium chloride	5,0
Disodium phosphate	1,2
Potassium dihydrogen phosphate	0,8
Phenol red	0,012
Agar	15,0

Besiyerinden 2,4 g tartılıp 95 mL distile su içinde çözündürülür. Otoklavda 115 °C’de 20 dakika steril edilir. 50 °C’ye soğutulan besiyeri içine %40’lık üre solüsyonu, şırınga ucu filtreden geçirilip steril edildikten sonra eklenir. Tüplere dağıtıldıktan sonra 2-8 °C’de muhafaza edilebilir.

Mikroorganizmanın taze üretilmiş kültüründen iğne öze yardımıyla 1-2 koloni alınmış ve tüpteki üreli besiyeri içine batırılarak ekim yapılmıştır. 37 °C’de 1-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda besiyerinin sarı renginin pembe-kırmızı renge dönüşmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Renk değişimi olmaması negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.6. Üreaz testi; A: Üreaz negatif; B: Üreaz pozitif

3.5.4. İndol testi

Bazı bakteriler sahip oldukları triptofanaz enzimi aracılığı ile triptofan içeren zengin besiyeri içerisinde, triptofandan indol, skatol, indol asetikasit, pirüvik asit, amonyak gibi oksidasyon ürünleri oluştururlar. Oluşan ürünlerden benzilpropil olan indol bir aldehit olan paradimetilaminobenzaldehit ile birleşerek kırmızı renk oluşturur. 1,5 ml triptofan içeren ependorf tüplerine üreme olan numunelerden inoküle edilip optimum sıcaklıkta 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 0,2–0,6 ml kovaks ayracı ilave edilmiş ve üst kısımda kırmızı-pembe renk oluşturanlar pozitif, sarı-kahverengi renk oluşturanlar negatif olarak değerlendirilmiştir.

Bu test, mikroorganizmaların triptofan aminoasidini ayrıştırarak indol oluşturma yeteneğini belirlemek için kullanılır.

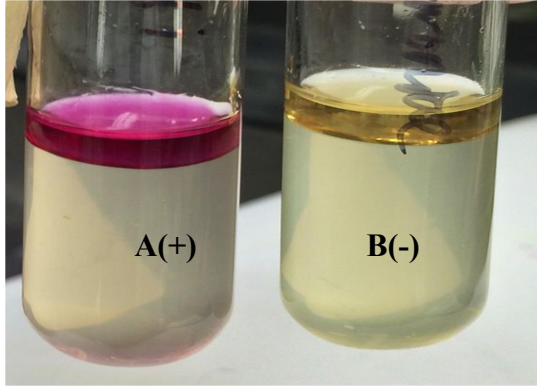
Tryptone water

Bileşimi:	g/l
Tryptone	10,0
Sodium chloride	5,0
pH	7,5±0,2

Besiyerinden 15 g tartılıp 1000 ml distile su içerisinde çözdürülür, 121 °C 'de 15 dakika steril edilir.

Kovaks ayracı

İzoamil veya İzobutil alkol	75 ml
p-dimetil aminobenzaldehit	5 g
Konsantre HCl	25 ml



Resim 3.7. İndol testi; A: İndol pozitif; B: İndol negatif

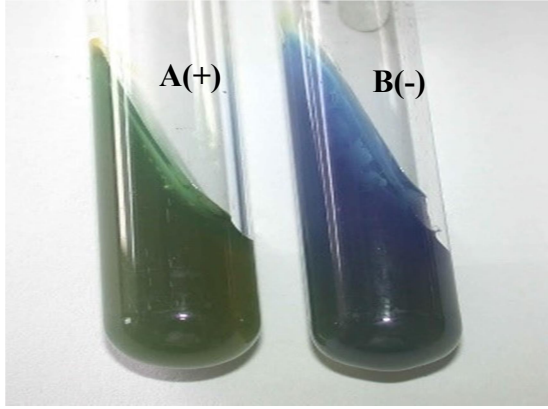
3.5.5. Sitrat testi

Bazı bakteriler karbon ve enerji kaynağı olarak sitratlar kullanabilirler. Sitrat testi, bakterinin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığını belirlemek amacı ile yapılır. Kültür süspansiyondan, Simmon's sitrat yatık agar besiyerine öze ile sürme ekim yapılarak optimum sıcaklıkta 2-7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Orjinal rengi yeşil olan ve indikatör olarak %0,2 brom timol mavisi kullanılan besiyerinde, besiyeri renginin maviye dönüşmesi ve ekim hattı boyunca üreme gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Simmon's Sitrat Agar (Oxoid CM 155)

Bileşimi:	g/l
Magnesium sulfate	0,2
Ammonium dihydrogen phosphate	0,2
Sodium ammonium phosphate	0,8
Sodium citrate	2,0
Sodium chloride	5,0
Bromine thymol blue	0,08
Agar	15,0

Besiyeri 23,28 g /l olacak şekilde distile su içerisinde çözülür. Agar eriyene dek kaynar su banyosunda tutulur. Tüplere dağıtılarak, otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Tüpler otoklavlama sonrası yatık vaziyette katılaşmaya bırakılır.



Resim 3.8. Sitrat testi; A: sitrat pozitif; B: sitrat negatif

3.5.6. Metil Red (MR)-Voges-Proskauer (VP) testi

Bazı bakteriler, ortamda bulunan glukozu kullanarak çeşitli organik asitler oluştururlar ve sonuçta ortamın pH'sı düşer. Bu özellikten faydalanarak bakterilerin glukozdan asit oluşturup oluşturmadığını belirleyebilmek amacı ile metil red testi yapılır. Bu testte kullanılan metil red indikatörü pH 6,2'de sarı, pH 4,2 ve altında ise kırmızı bir renk oluşturur. Diğer taraftan bazı bakteriler de glukoz bulunan ortamda glukozu kullanarak 2,3- bütillen glikol gibi çeşitli nötral ürünler oluştururlar. Bulardan asetoin, ortama alkali bir madde eklendiğinde okside olarak diasetil'e dönüşür. Bu madde ise peptondaki kreatin, arjinin veya kreatinin ile birleşerek pembe-kırmızı bir renk oluşumuna neden olur. Metil red ve Voges-Proskauer testleri çoğu analizde beraberce uygulanır.

Test edilecek her izolat için 2 ayrı Metil red- Voges Proskauer (MR-VP) besiyeri içeren tüp hazırlanmıştır. izolatlar MR-VP sıvı besiyerine ekilip, 37 °C 'de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Metil Red testi için, 5 ml kültüre 5 damla metil red indikatörü eklenmiştir. Rengin kırmızı-pembeye dönmesi testin pozitif, sarı kalması ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Voges-Proskauer testi için, inkübasyon sonucunda besiyerine 0,6 ml alfa-naphtol + etil alkol karışımı olan VP indikatörü ve 0,2 ml %40'lık KOH ilave edilmiştir. Test sonucunda pembe renk oluşumu (+), sarı renk oluşumu ise (-) olarak değerlendirilmiştir.

Metil Red- Voges Proskauer (MR-VP) Broth (Merck 1.05712.0500)

Bileşimi:	g/l
Peptone (etten)	7,0
D (+)glucose	5,0
Phosphate buffer	5,0
pH	6,9±0,1

Besiyerinden 17 g/l olacak şekilde distile su içerisinde çözülür, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır.

MR indikatörü

Methyl red	0,2 g
95% ethyl alcohol	50 ml
Distilled water	50 ml

Metil red 50 ml etil alkol içerisinde homojen hale getirildikten sonra çözeltiye 50 ml distile su eklenerek 100 ml'lik indikatör solüsyon hazırlanır.

VP indikatörü

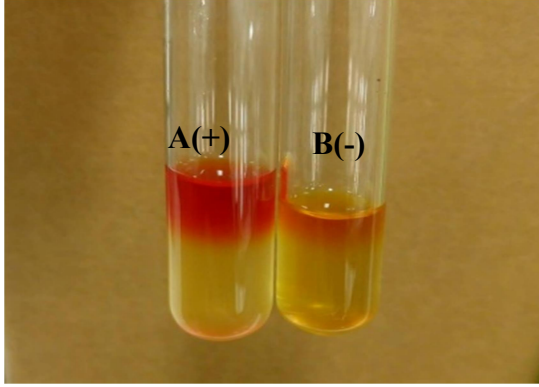
Alpha naphthol	5 g
Ethyl alcohol	100 ml.

5 gr Alfa -naftol 100 ml etil alkol içerisinde homojen hale getirilerek indikatör solüsyon hazırlanır.

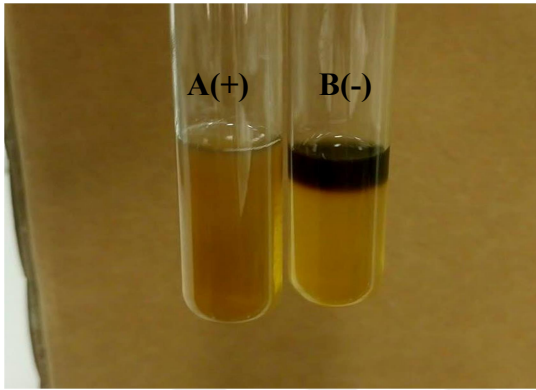
%40 KOH

Potassium hydroxide	40 g
Distilled water	100 ml

40 gr potasyum hidroksit 100 ml distile su içerisinde homojen hale getirilerek %40'lık KOH solüsyonu hazırlanır.



Resim 3.9. Metil red testi; A: Metil red pozitif; B: Metil red negatif



Resim 3.10. VP- testi; A: Voges-Proskauer pozitif; B: Voges-Proskauer negatif

3.5.7. Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Triple Sugar Iron Agar, üç karbonhidrat (glukoz, laktoz ve süktroz) içerir. Bu karbonhidratlar fermente edildiğinde, oluşan asit üretimi fenol kırmızısı indikatörü ile saptanır. Oluşan renk değişimleri asit üretimi için sarı ve alkalinizasyon için kırmızıdır. Laktoz ve süktroz, glukozdan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğundan, uçta asit oluşumu bu şekerlere bağlı iken, glukozdan asit oluşumu tüpün yatık alanında az miktarda asidin hızlı oksidasyonu ile baskılanarak yalnızca glukoz fermente olduğunda nötral veya bazik pH reaksiyonuna yol açar.

Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Oxoid CM227)

Bileşimi:	g/l
Lab-Lemco Powder	3,0
Yeast extract	3,0
Peptone	20,0
Sodium chloride	5,0
Lactose	10,0
Sucrose	10,0
Glucose	1,0
Ferric citrate	0,3
Sodium thiosulphate	0,3
Phenol red	0,5
Agar	12,0

pH: $7,4 \pm 0,2$ ayarlanarak besiyeri tüplere taksim edilmiştir. 121 °C'de 15 dk steril edilen tüplerdeki besiyeri yatık bir şekilde katılaşmaya bırakılmıştır. İncelenecek kültürlerden iğne öze ile yoğun miktarda örnek alınıp, yatık agar yüzeyine sürme ekim yapılmış ve öze bu işlem sonunda besiyerinin dip kısmına batırılıp çıkarılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Resim 3.11. TSI testi sonucu renk değişimleri

Çizelge 3.1. TSI'da sonuçların değerlendirilmesine yönelik kriterler

Dip Kısım	Yatık Yüzey	Sonuç
Değişme yok/kırmızı	Kırmızı	Alkali
Sarı	Sarı	Asit
Sarı	Kırmızı	Asit-Alkali

3.5.8. Karbonhidrat testleri

Karbonhidrat fermentasyon besiyeri- Purple broth base

Bileşimi:	g/L
Protease peptone	10,0
Meat extract (Lab-Lemco powder)	1,0
Sodium chloride	5,0
Bromine cresol blue	0,02
pH	6,8 ± 0,2

Besiyeri 1000 ml distile su içinde çözülür, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. Bakterilerin karbonhidrat testlerinde kullanılan temel besiyeridir. Besiyerlerinin rengi indikatör madde (Brom kresol mavisi) den dolayı koyu menekşe rengindedir.

Karbonhidrat solüsyonu:

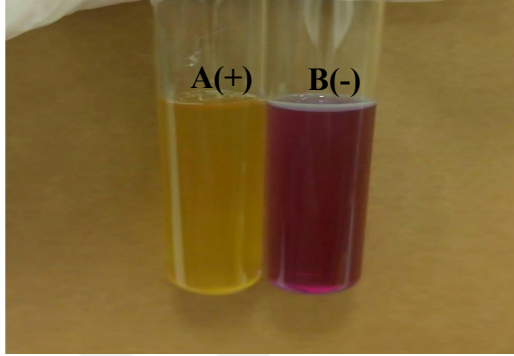
Bacillus'ların tanımlanmasında kullanılan şekerler glukoz, ksiloz, laktoz, maltoz, mannitol, sükroz'dur. *Clostridium*'ların tanımlanması veya teşhisinde kullanılan şekerler ise glukoz, laktoz, sükroz, salisin'dir

Carbohydrate: 1,0 gr

Distilled water: 10,0 ml

Hazırlanan solüsyonlar 0,2-0,45 µm'lik membran filtre ile steril edilmiştir. Bu solüsyonundan steril pipet ile 1 ml alınıp önceden hazırlanmış 9 ml'lik temel besiyerine (Purple Broth Base) ilave edilmiştir.

Besiyerine 0,2 ml aktif *Bacillus* kültürlerinden alınıp 1-3 gün 37 °C'de inkübe edilmiştir. Şekeri kullanarak asit üreten türler besiyerinin rengini sarıya dönüştürmüştür. Negatif reaksiyonda ise renk değişikliği gözlenmemiştir.



Resim 3.12. Karbonhidrat fermentasyon testi; A: Pozitif sonuç; B: Negatif sonuç

3.6. Enzimatik ve Patojenik Özelliklerin Aranmasında Kullanılan Testler

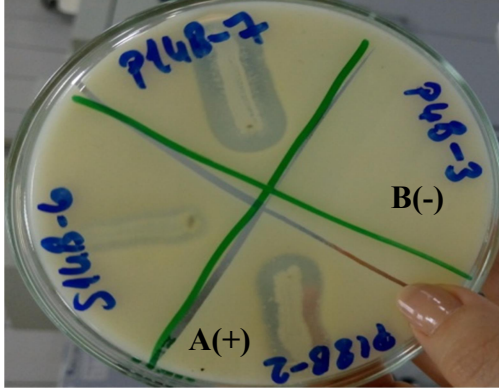
3.6.1. Proteolitik aktivite testi

Skim Milk Agar Besiyeri: Alkalen proteaz üreticisi izolatların belirlenmesinde seçici besiyeri olarak kullanılmıştır. Test edilecek kültürden alınan bakteriler besiyerine çizgi şeklinde inoküle edilmiştir. İnkübasyon sonucu besiyerinde üreyen bakterinin etrafında şeffaf zon oluşturması proteolitik aktivite pozitif olarak, zon oluşturmaması ise proteolitik aktivite negatif olarak değerlendirilmiştir.

Skim Milk Agar

Skim milk powder	25,0 g
Distilled water	250 ml
Agar	5,0 g

Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. Her iki karışım 50 °C'ye gelince karıştırılır ve petrilere dökülür.



Resim 3.13. Proteolitik Aktivite testi; A: Pozitif sonuç; B: Negatif sonuç

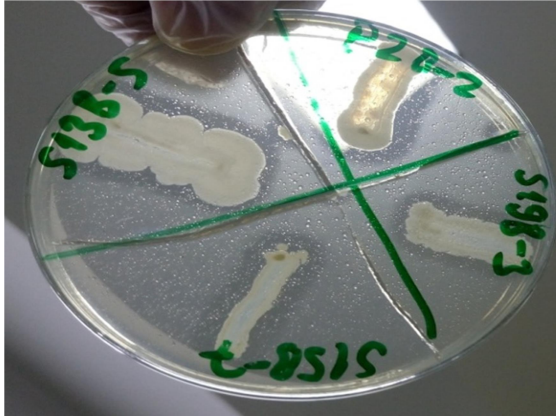
3.6.2. Lipolitik aktivite testi

Test edilecek kültürden alınan bakteriler besiyerine çizgi şeklinde inokülasyon yapılmıştır. 30 °C 24 saatlik inkübasyon sonunda besiyerinde şeffaf zon oluşumu pozitif lipolitik aktivite (+) olarak değerlendirilmiştir.

Tributyryn Agar

Bileşimi:	g/l
Meat pepton	2,5
Kazein pepton	2,5
Yeast extract	3,0
Agar	12
pH	7,5 ±0,2

Tributyryn Agar besiyerinden 20 g/l olacak şekilde distile su içerisinde çözülüp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. Daha sonra besiyeri oda sıcaklığına kadar soğutulur ve hızlıca karıştırılarak üzerine 10ml/1000ml oranında Tributyrin ilave edilir.



Resim 3.14. Lipolitik aktivite sonucu zon oluşumu

3.6.3. Lesitinaz testi

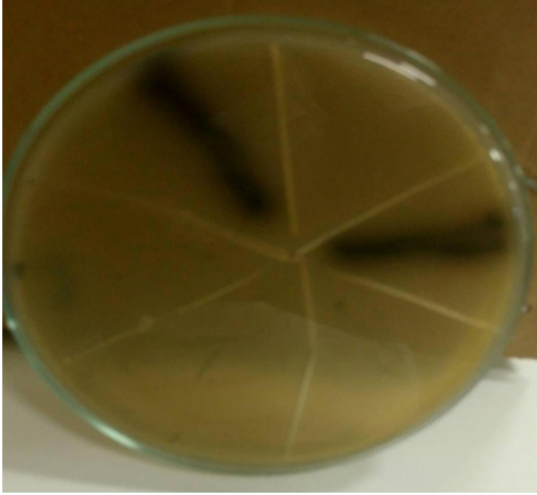
Egg yolk tellurit içeren Baird Parker Agar besiyerine bir gecelik bakteri kültürlerinden ekim yapıldı ve lesitini hidrolize edip etmediği kontrol edildi. Siyah-gri renkli kolonilerin etrafında berrak bir zon oluşması pozitif lesitin hidrolizi olarak değerlendirilmiştir.

(1) BP (Baird Parker Medium)

Kazeinin pankreatik parçalanması	10,0 g
Meat extract	5,0 g
Yeast extract	1,0 g
Sodium pyruvate	10,0 g
Glycine	12,0 g
Lithium chloride	5,0 g
Agar	12,0 g – 22,0 g arası
Distilled water	950 ml
pH	7,2±0,2

(2) Egg yolk Tellurite Emulsion

Basic medium	100,0 ml
Potassium tellurite solution	1,0 ml
Egg yolk emulsion	5,0 ml



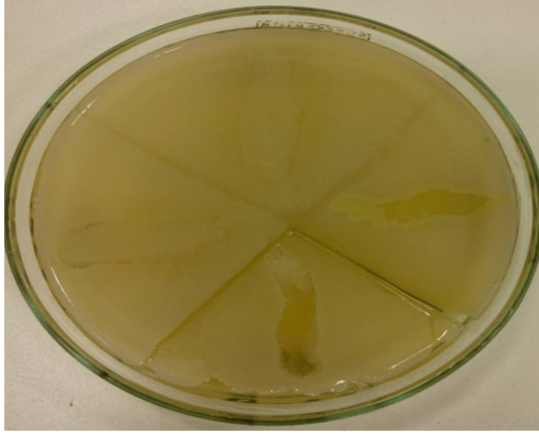
Resim 3.15. Lesitinaz (Fosfolipaz) aktivitesi görüntüsü

3.6.4. DNaz testi

Bileşim	g/L
Tryptose	20,0
NaCl	5,0
Deoxyribonucleic acid	2,0
Agar-agar	15,0

Dehidre besiyeri 42,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilip 45-50 °C'a soğutulur ve steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri yanar-döner ve kahverengi olup, 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir.

DNaz içeren bakteriler, besiyerindeki DNA'yı hidrolize eder. Taze kültürlerden DNaz Agar'a nokta tarzında ekimler yapılır. 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Üreyen koloniler üzerine 1 N HCl dökülerek koloniler etrafında ki bulanıklılığın açılmasına göre değerlendirilir.



Resim 3.16. DNaz aktivitesi görüntüsü

3.6.5. Jelatin hidrolizi

Bu test, mikroorganizmalarda, jelatini hidrolize eden jelatinaz enziminin varlığını ortaya koymak için kullanılır. Bazı organizmalar jelatinaz ismi verilen bir enzimi üreterek, jelatini hidrolize ederler. Ortaya çıkan peptidler ve amino asitler bakteriler için karbon kaynağı olarak kullanılabilirler. Jelatin üzerinde bakterilerin etkisi besiyerine jelatin katılması ile test edilebilir. Jelatin soğutulduğu zaman katı formdadır. Ancak bakteri inokülasyonu sonrasında jelatin hidrolize uğrarsa bakterilerin sıvılaştırmaya yönelik olarak jelatinaz enzimi salgıladıkları düşünülebilir.

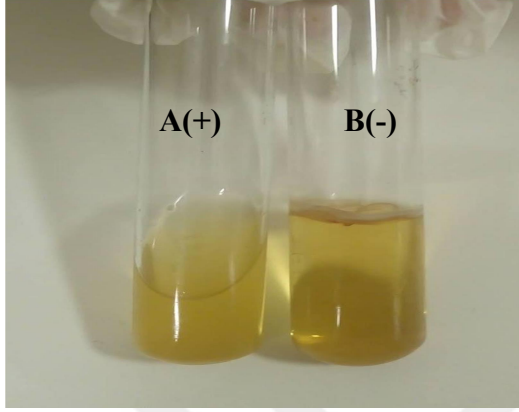
Jelatin Hidroliz Testi Besiyeri

Bileşimi:	g/l
Enzymatic Digest of Gelatin	5,0
Beef extract	3,0
Gelatin	120,0
pH	6.8 ± 0,2

Besiyerinden 128 g tartılarak 1 lt distile su içinde çözündürülür. 5 ml olacak şekilde tüplere dağıtılır ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilir. +4 °C'de saklanabilir.

İğne uçlu öze ile alınan mikroorganizma kültürünün jelatinli besiyerine ekimi yapıp ve 37 °C'de inkübasyonu yapılır. (15 güne kadar) Bu süre sonunda besiyerleri +4 °C'de 1-2 saat bekletilerek jelatinin hidrolizi kontrol edilir. Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda

4 °C'den çıkarılınca jelatinli besiyerinin sıvı halinde ve katılaşmadığı görülür. Bu durumda jelatin hidrolizasyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Negatif durumda ise tüplerdeki sıvı besiyerinin katılaşmış gözlenmiştir



Resim 3.17. Jelatin testi; A: Jelatin hidrolizi pozitif; B: Jelatin hidrolizi negatif

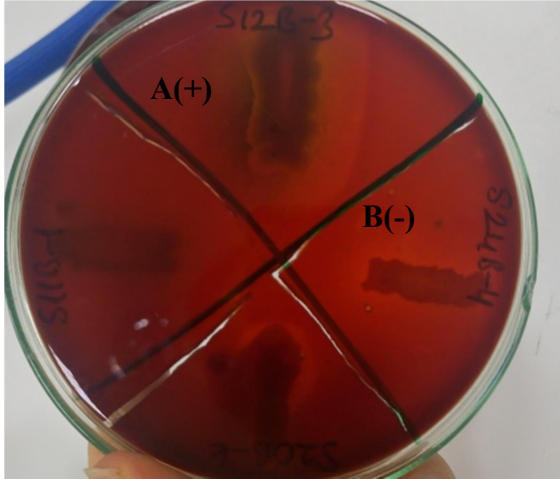
3.6.6. Hemoliz testi

Bu test, mikroorganizmaların hemolitik aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılır. Hazırlanan Koyun Kanlı Agar'da üretilen mikroorganizma kültürlerinden alınan kolonilerin tek koloni ekimi yapılarak 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda koloniler çevresinde hemoliz bölgeleri değerlendirilmiştir.

Blood Agar Base

Bileşimi:	g/l
Nutrient substrate (heart extract and peptones; kalp ekstraktı ve peptonlar)	20,0
NaCl	5,0
Agar-agar	15,0
pH	6,8 ± 0,2

Dehidre besiyeri 40,0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında 45-50 °C'a soğutulur, %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Bazal besiyeri berrak, sarımsı kahverengindedir ve 25 °C'da pH'sı 6,8±0,2'dir.



Resim 3.18. Hemoliz testi; A: Pozitif sonuç B: Negatif sonuç

3.6.7. Siderefor testi

İzolatların siderofor tayinleri için Chrome Azurol Sulphate (CAS) Agar kullanılmıştır. (Schwyn ve Neilands yöntemi) Tryptic soy agar besiyerine ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılan kültürlerden 2-3 koloni alınarak CAS agara inoküle edilmiştir. 30-35 °C’de 24 saat’lik inkübasyon sonrasında mavi-turkuaz renkteki CAS agarın sarı-turuncuya dönmesi siderofor varlığı pozitif olarak yorumlanır.

Chrome Azurol Sulphate (CAS) Agar

CAS indikatör solüsyonunun hazırlanması

Bileşimi:	g/l
Chrome Azurol S (CAS)	60,5 mg
Demir-III klorid heksahidrat (Iron(III) chloride hexahydrate)	27 mg
Hydrochloric acid (HCl)	83,3 µl
Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA)	72,9 mg

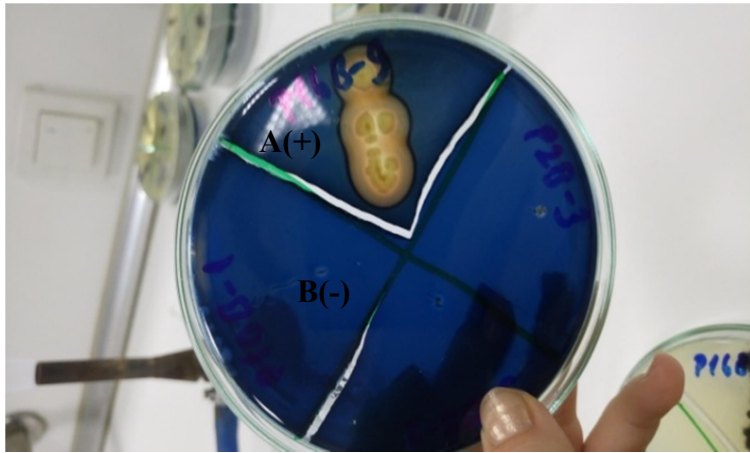
CAS indikatör solüsyonunu hazırlamak için ilk olarak 60,5 mg CAS 50 ml distile suda çözündürülür ve üzerine 10 ml Iron III solüsyonu eklenir (Iron III solüsyonu 100 ml distile suya eklenir 83,3 µl konsantre HCl üzerine 27 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ilave edilerek hazırlanır). Hazırlanan solüsyona 40 ml distile suda çözündürülmüş 72,9 mg HDTMA karıştırılarak yavaşça eklenir. Hazırlanan koyu mavi likit 121 °C’de 15 dakika steril edilir.

Basal agarın hazırlanması

3-(N-morpholino)propane sulfonic asit (MOPS)	3,0 gr
Agar	1,5 gr
Sodium chloride	0,05 gr
Potassium phosphate	0,03 gr
Ammonium chloride	0,01 gr
L-asparagine	0,5 gr
Distilled water	83 ml
% 50 NaOH	5 ml

100 ml basal agar hazırlamak için agar hariç yukarıda sıralanan tüm maddeler 83 ml distile suda eritilir ve besiyerinin pH'sı NaOH solüsyonu ile 6,8'e ayarlanır. Daha sonra 1,5 gram agar karıştırılarak ilave edilir. Karışım 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Steril edilmiş basal agar ve CAS indikatörü öncelikle 50 °C sıcaklıktaki bir su küvetinde soğutulmuştur. Bu işlemi takiben 2 ml % 50'lik glukoz solüsyonu basal agar üzerine karıştırılarak eklenir. CAS indikatörü de bu karışım üzerine yavaşça ve karıştırılarak ilave edilir.

Steril plaklara bu karışımdan 30 ml dökülür. CAS agara inoküle edilen izolatlar 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında koloniler etrafında yeşil agar'ın sarıya dönmesi siderofor varlığı pozitif olarak yorumlanmıştır.



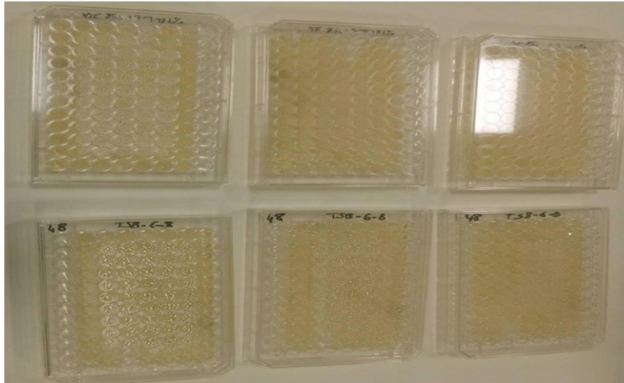
Resim 3.19. Siderofor testi; A: Pozitif sonuç B: Negatif sonuç

3.7. İzole Edilen *Bacillus* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Bacillus izolatlarında biyofilm varlığının oluşumu mikroplate kullanılarak araştırılmıştır. *Bacillus* izolatları Nutrient Agar'da 18 – 24 saat inkübe edilmiştir.

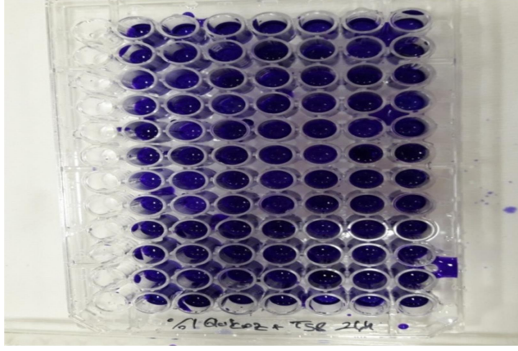
Taze kültürlerden, % 1 Glukoz içeren Tryptic Soy Broth içeren tüplere McFarland 0,5 bulanıklık olacak şekilde inoküle edilmiştir. Tüplerdeki bu süspansiyonlardan, mikroplate kuyucuklarına, her bir süspansiyondan 2'şer kuyucuğa olacak şekilde 200'er µl dağıtılmıştır.

Mikroplate'lerin 2'şer kuyucuğuna bakteri süspansiyonu edilmemiş %1 oranında glukoz içeren Tryptic Soy Broth besiyerinden 200'er µl eklenmiş ve kontrol için kullanılmıştır. Aynı işlem 3 farklı mikroplate için yapılmıştır. Mikroplatelerden 1 tanesi 37 °C'de 24 saat, diğeri 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.



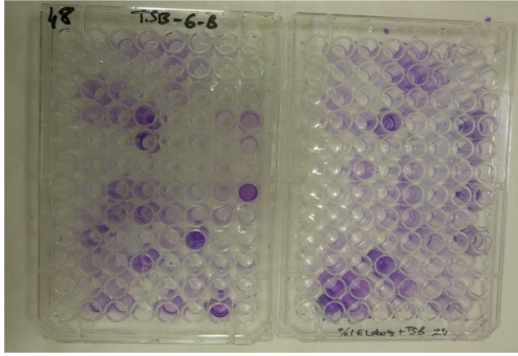
Resim 3.20. Bakteri solüsyonundan ilave edilen mikroplate kuyucukları

Mikroplateler, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 3 kez distile su ile yıkanmış ve mikroplate kuyucuklarına %0,1'lik hazırlanan kristal viyole solüsyonundan 200'er µl dağıtılarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.



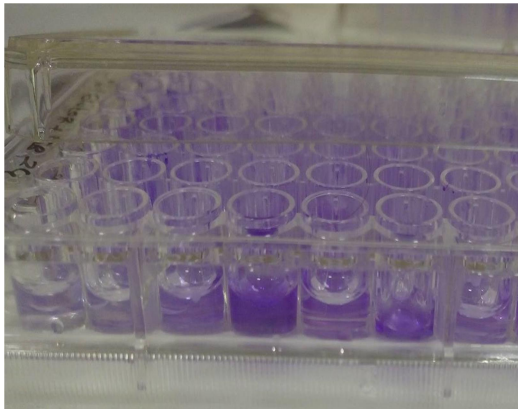
Resim 3.21. Kristal viyole ilave edilen mikroplate kuyucukları

Sonra, yeniden 3 kez distile su ile yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır.



Resim 3.22. Distile su ile yıkanılıp kurutulan mikroplateler

%0,1'lik Kristal viyole solüsyonu eklenen mikroplate'in kuyucuklarına %95'lik Etanol çözeltisinden 200'er µl eklenmiş ve 10 dakika bekletilmiştir.



Resim 3.23. Etanol çözeltisi ilave edilen mikroplateler

Mikroplateler spektrofotometre cihazında 570 nm. dalga boyunda okutulmuştur. Aynı işlemler 48 saat inkübe edilen mikroplateler içinde uygulanmıştır. Sonuçlar, kontrol için kullanılan mikroplate kuyucuklarının spektrofotometre cihazında okutulması ile elde edilen değerlere göre 1 pozitif (+), 2 pozitif (++), 3 pozitif (+++) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.7.1. *Bacillus* türlerinin biyofilm varlığının tespit edilmesinde kullanılan besiyerleri ve içerikleri

Tryptic Soy Broth (TSB)

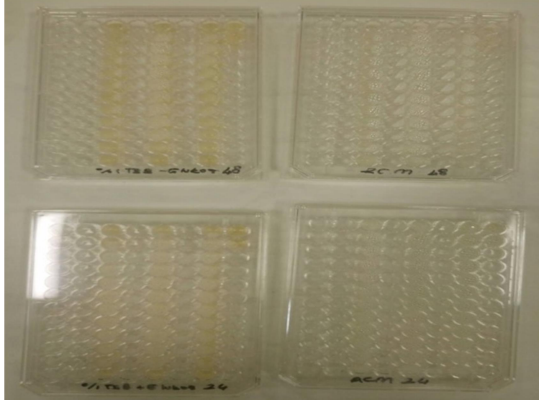
Bileşimi:	g/l
Peptone from casein	15,0
Peptone from soymeal	5,0
NaCl	5,0
Agar-agar	15,0

Dehidre besiyeri, 40,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir.

3.8. İzole Edilen *Clostridium* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Clostridium izolatlarında biyofilm varlığının oluşumu mikroplate kullanılarak araştırılmıştır. *Clostridium* izolatları Reinforced Clostridial Agar'da anaerobik koşullarda 24-48 saat inkübe edilmiştir.

Taze kültürlerden, % 1 Glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) ve Reinforced Clostridial Medium (RCM) içeren tüplere McFarland 0,5 bulanıklık olacak şekilde inoküle edilmiştir. Tüplerdeki bu süspansiyonlardan, mikroplate kuyucuklarına, her bir süspansiyondan kuyucuğa 200'er µl. dağıtılmıştır.

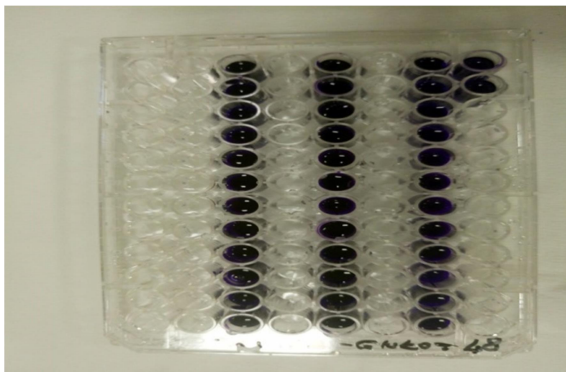


Resim 3.24. Bakteri solüsyonundan ilave edilen mikroplate kuyucukları

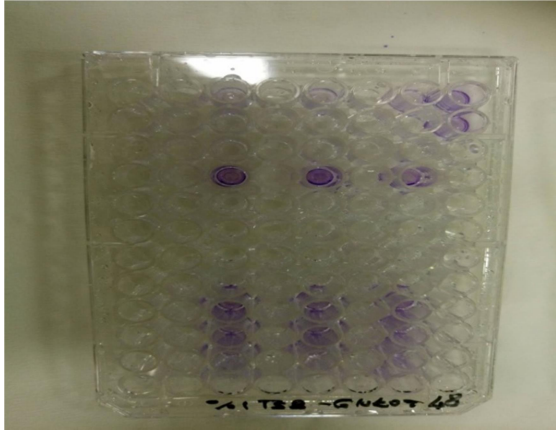


Resim 3.25. Bakteri solüsyonundan ilave edilen mikroplate'lerin anaerobik ortamda inkübasyonu

% 1 Glukoz içeren TSB içeren mikroplateler, 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmış bu süre sonunda 3 kez distile su ile yıkanmış ve mikroplate kuyucuklarına % 0,1'lik hazırlanan kristal viyole solüsyonundan 200'er µl dağıtılarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tekrar yeniden 3 kez distile su ile yıkanmış ve kurutma kâğıdına ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır.



Resim 3.26. Kristal viyole ilave edilen mikroplate kuyucukları

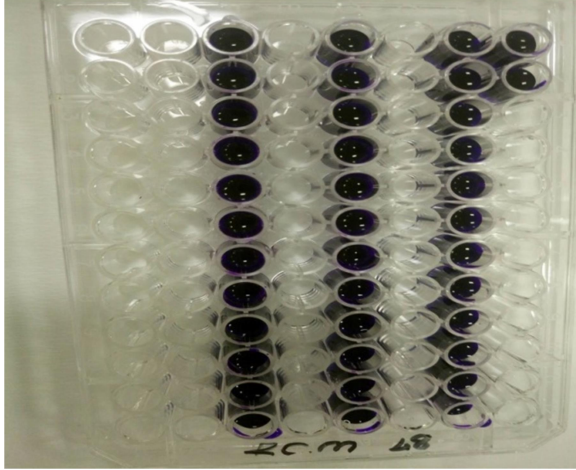


Resim 3.27. Distile su ile yıkanılıp kurutulan mikrolateler

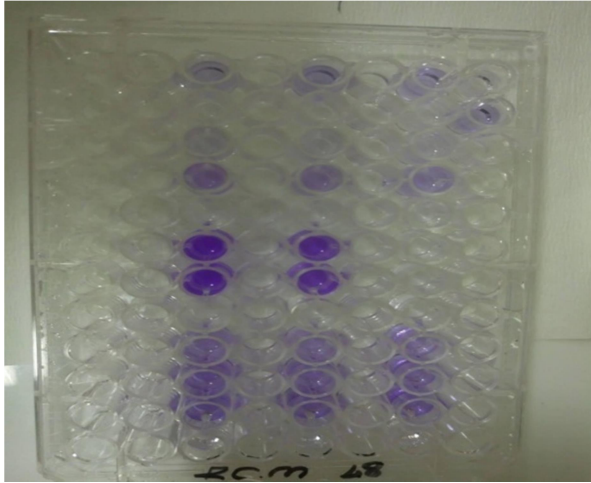
%0,1'lik Kristal viyole solüsyonu eklenen mikrolate'in kuyucuklarına %95'lik Etanol çözeltisinden 200'er μ l eklenmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. Mikrolateler spektrofotometre cihazında 570 nm. dalga boyunda okutulmuştur. Sonuçlar, kontrol için kullanılan mikrolate kuyucuklarının spektrofotometre cihazında okutulması ile elde edilen değerlere göre 1 pozitif (+), 2 pozitif (++), 3 pozitif (+++) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

Reinforced Clostridial Medium içeren mikrolatelerin ise 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda içeri dikkatlice dökülmüştür. Ardından 200'er μ l'lik %2,5 glutaraldehit çözeltisi kuyucuklara bakteriyi sabitlemek amacı ile eklenmiştir ve dökülmüştür. Ardından kuyucuklara 200'er μ l'lik fosfat tamponlu salin (PBS) eklenmiş ve dökülmüştür. Boşalan kuyucukların içerisine 200 μ l % 0,25'lik hazırlanan kristal viyole solüsyonundan eklenip 5 dakika beklenmiştir. Bu süre sonunda kuyucuklar 8 kez PBS ile yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerine mikrolateler ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan mikrolate kuyucuklarına 1:1 oranda etanol-aseton çözeltisinden konulmuştur ve 5 dk sonra mikrolateler spektrofotometre cihazında 570 nm. dalga boyunda okutulmuştur [127].

Sonuçlar, kontrol için kullanılan mikrolate kuyucuklarının spektrofotometre cihazında okutulması ile elde edilen değerlere göre 1 pozitif (+), 2 pozitif (++), 3 pozitif (+++) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.28. Kristal viyole ilave edilen mikroplate kuyucukları



Resim 3.29. 1:1 oranda etanol-aseton çözeltisi içeren kuyucuklar

3.8.1. *Clostridium* türlerinin biyofilm varlığının tespit edilmesinde kullanılan besiyerleri ve içerikleri

Tryptic Soy Broth (TSB)

Bileşimi:	g/l
Peptone from casein	15,0
Peptone from soymeal	5,0
NaCl	5,0
Agar-agar	15,0

Dehidre besiyeri, 40,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir.

Reinforced Clostridial Medium

Bileşimi:	g/l
Meat extract	10,0
Peptone	5,0
Yeast extract	3,0
D(+) Glucose	5,0
Starch	1,0
NaCl	5,0
Sodium acetate	3,0
L-Cysteinium chloride	0,5
Agar-agar	0,5

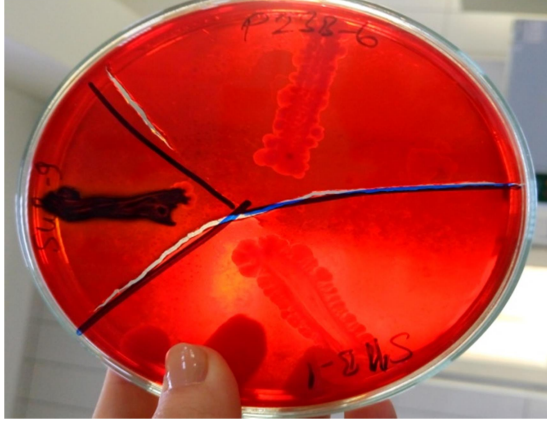
Dehidre besiyeri 33,0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, tüplere 10'ar mL dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilir.

3.9. Kongo Red Bağlama (Slime Faktör Testi)

Kongo red agar

Bileşimi:	g/l
Brain heart infusion solid	17,5
Tryptose	10,0
Glucose	2,0
Sodium chloride	5,0
Disodium hydrogen phosphate	2,5
Sucrose	50
Congo red	0,8
Agar	10
pH	7,3±0,2

Besiyeri 97,8 g/l olacak şekilde distile suda çözülüp, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır.



Resim 3.30. Slime faktör testi

3.10. *Bacillus* izolatlarının BBL Crystal Identification System Gram-Positive ID Kit Kullanılarak Tür Seviyesinde Adlandırılması

Biyokimyasal testlerle adlandırılması yapılan *Bacillus* izolatlarının tür seviyesinde adlandırılması için BBL Crystal Identification System Gram-Positive ID Kit kullanılmıştır. Bu kit, mikroorganizmaların çeşitli enzimatik hidroliz aktiviteleri, trealoza, laktoza, sükröze, manitol, maltotriöze, arabinoza, fruktoza karbonhidratlarını kullanımı, üreaz enzimi varlığını, eskülin hidrolizini, arjinin kullanımı ve beta- galaktozidaz enzim varlığını belirleyen testlerden oluşan bir identifikasyon sistemidir.

Çizelge 3.2. BBL identifikasyon sisteminin içerdiği testlerin prensipleri

Panel Konumu	Substrat	Kod	Pozitif	Negatif
4A	Floresans negatif kontrol	FCT	n/a	n/a
2A	4MU- α -D-glukozid	FGC	Mavi floresans	Mavi floresans
1A	L -valin	FVA	Mavi floresans	Mavi floresans
4B	L-fenilalanin	FPH	Mavi floresans	Mavi floresans
2B	4MU- α -D-glukozid	FGS	Mavi floresans	Mavi floresans
1B	L-pyroglutamik asit AMC	FPY	Mavi floresans	Mavi floresans
4C	L-triptofan	FTR	Mavi floresans	Mavi floresans
2C	L-arjinin	FAR	Mavi floresans	Mavi floresans
1C	4MU-N-asetil- β -D- glukozamid	FGA	Mavi floresans	Mavi floresans
4D	4MU-fosfat	FHO	Mavi floresans	Mavi floresans
2D	4MU- β -D-glukuronid	FGN	Mavi floresans	Mavi floresans
1D	L-izolösin	FIS	Mavi floresans	Mavi floresans
4E	Trealoz	TRE	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı
2E	Laktoz	LAC	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı
1E	Metil- α & β -glukozid	MAB	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı
4F	Sükroz	SUC	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı
2F	Mannitol	MNT	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı
1F	Maltotrioz	MTT	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı

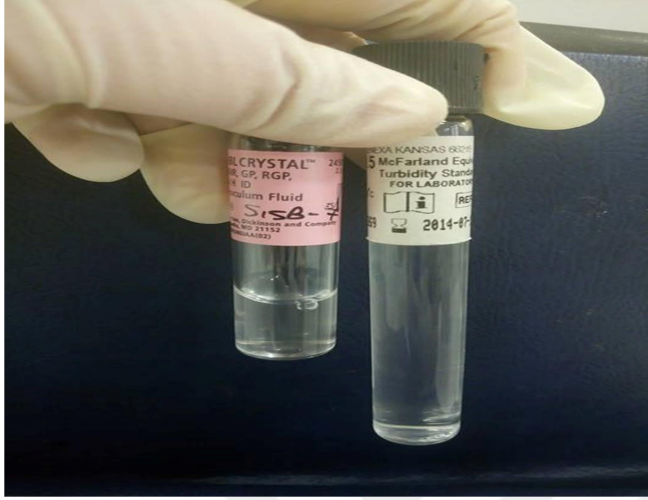
Çizelge 3.2. (devam) BBL identifikasyon sisteminin içerdği testlerin prensipleri

4G	Arabinoz	ARA	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı
2G	Gliserol	GLR	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı
1G	Fruktoz	FRU	Altın-Sarı	Turuncu-Kırmızı
4H	p-nitrofenil-β- D-glukozid	BGL	Sarı	Renksiz
2H	p-nitrofenil-β- D-sellobiyoz	PCE	Sarı	Renksiz
1H	Prolin & lösin- p-nitroanilid	PLN	Sarı	Renksiz
4I	p-nitrofenil-fosfat	PHO	Sarı	Renksiz
2I	p-nitrofenil-α- D maltozid	PAM	Sarı	Renksiz
1I	ONPG & p-nitrofenil-α-D-galaktozid	PGO	Sarı	Renksiz
4J	Üre	URE	Mavi	Sarı-Yeşil
2J	Eskülin	ESC	Kahve-Bordo	Bronz-Parlak
1J	Arjinin	ARG	Mor-Eflatun	Sarı-Gri

Typticase Soy Agar with %5 Kanlı Agar

Bileşimi	g/L
Pancreatic Digest of Gelatin	14,5
Papaic Digest of Soybean Meal	5,0
Sodium chloride	5,0
Agar	14,0
Growth Factors	1,5
Blood Agar	% 5

Deney için 8-24 saatlik kültürler kullanılmıştır. Bu kültürlerden alınan koloniler hazır kit broth'ları içine inoküle edilip 0,5 McFarland bulanıklık olacak şekilde ayarlanıp vortex yardımı ile homojenize edilmiştir.

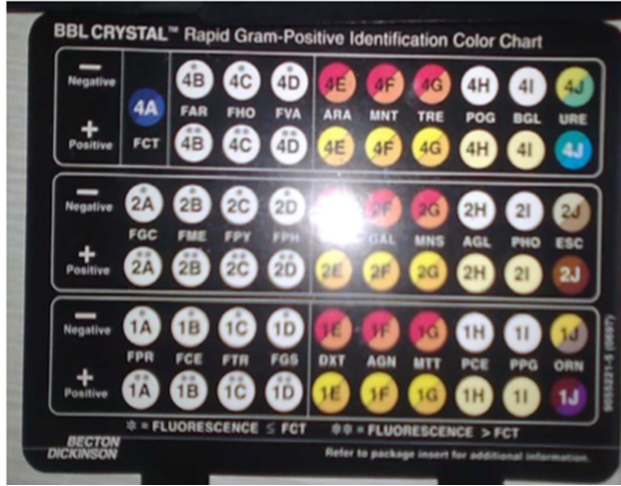


Resim 3.31. 0,5 McFarland bulanıklık tüpüne göre ayarlanan bakteri kültürü içeren hazır kit broth

Bakteri kültürü içeren süspansiyonlar, BBL Crystal Base paneline boşaltılmış ve tüm kuyucukların süspansiyonla dolması sağlanmıştır. BBL Crystal GP ID Panel kapakları kapatılmıştır. Paneller ters çevrilerek 35-37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda paneller BBL Crystal Panel Viewer cihazı kullanılarak ve BBL Crystal Gram-Positive Identification Color Chart tablosu yardımıyla okunmuş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.



Resim 3.32. BBL Crystal Panel Viewer Cihazı



Resim 3.33. BBL Crystal Gram-Positive Identification Color Chart Tablosu

Değerlendirme sonuçları bilgisayar ortamında, BBL Crystal Identification System programına aktarılarak tür tanımlaması yapılmıştır.

3.11. *Clostridium* İzolatlarının 16S rRNA Gen Dizisine Göre Adlandırılması

Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen gram pozitif, anaerob ortamda üreyen, katalaz negatif, mikroskopta sporlu basil olarak gözükten türler şüpheli *Clostridium* kolonileri olarak düşünülmüştür. Bu kolonilerin stokları yapılarak stok örnekler soğuk zincir ortamında 16S rRNA sonucuna göre tanımlanmak üzere REFGEN (Ankara Üniversitesi-Teknokent) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne gönderilmiştir.

16S rRNA dizi analizi

Bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan gen bölgesi 16S rRNA' dir. 16S rRNA gen bölgesi yaklaşık olarak 1550 bp uzunluğundadır. Prokaryotik ribozomlar, 30S ve 50S' lik altbirimlere sahip olup, 16S rRNA geni 30S' lik ribozom alt biriminde yer alır. Bu genler, mRNA'dan protein translasyonunda görev aldığı için organizmalar arasında son derece korunmuştur.

Ribozomal RNA (rRNA), GroEL chaperonin, RNA polymerase beta subunit (rpoB), DNA gyrase beta subunit (gyrB) vb. genler türler arasında yüksek oranda korunduğu için fi logenetik analizlerde sıklıkla kullanılan stabil marker genlerdir. Bu bağlamda, bakteride

bulunan ve ‘housekeeping’ (ev işçisi) olarak adlandırılan 16S rRNA geni birçok moleküler uygulamada popüler bir hedef olarak seçilmiştir. Bu gen dizilerinin ulaşılabilir olması ve mevcut veri tabanlarında GenBank, European Molecular Biology Laboratory gibi nükleotit dizilerinin varlığı moleküler yaklaşımlarda tercih edilme sebeplerindendir [108].

3.12. *Bacillus* ve *Clostridium* Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Araştırmada disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi

Test edilecek izolatın taze kültüründen birkaç koloni alınıp serum fizyolojik su 0,5 Mac Farland bulanıklığına ayarlanmış ve Mueller Hinton Agar besiyerine ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan besiyeri üzerine antibiyotik diskleri steril pens ile yerleştirilmiş ve 37 °C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. inkübasyon sonucu plaklarda oluşan zon çapları National Committee for Clinical Laboratory Standards (2009) tarafından önerilen zon tablosu ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

Mueller Hinton Agar

Bileşimi	g/l
Beef dehydrated infusion from	30,0
Casein hydrolysate	17,5
Starch	1,5
Agar	17,0

Besiyeri 21 g/l olacak şekilde distile su içinde çözülür, 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanır.

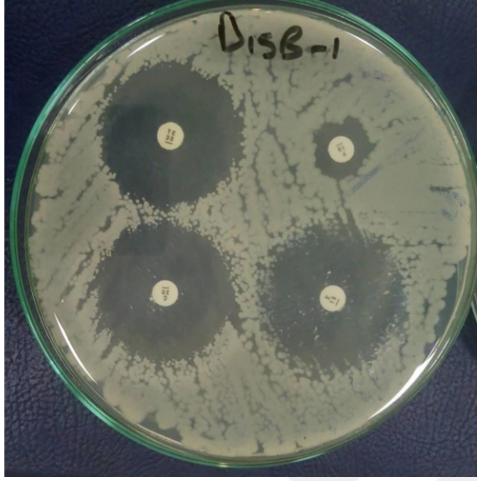
McFarland bulanıklılık Tüpü

0,5 Mc Farland standardına uygun bulanıklık tüpü hazırlamak için; baryum klorür ve sülfürik asit kullanılarak hazırlanan bu solüsyon deney tüplerine 5'er ml ilave edilerek oda sıcaklığında, karanlıkta saklanmıştır.

0,048 M BaCl₂ (% 1,175 gr BaCl₂·2H₂O) 0,5 ml

+0,18 M H₂SO₄/ H₂O (% 1 v/v) 99,5 ml

0,5 Mc Farland=108 cfu/ml



Resim 3.34. Antibiyotik duyarlılık testi

4. BULGULAR

Araştırmamızda çiğ süt, peynir, dondurma'da sporlu bakterilerin bulunma sıklığı ve bazı patojenite testleri çalışılmıştır. Bu amaçla toplam 100 örnekten izole edilen *Bacillus* ve *Clostridium* cinsleri tür düzeyinde standart yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Ayrıca Becton Dickinson (BD) BBL Crystal Identification Systems Gram-Pozitif ID kit ile *Bacillus* türlerinin, 16S rRNA (Refgen) tanımlama sistemi kullanılarak ise *Clostridium* türlerinin doğrulaması yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin çalışılan örnek sayısına göre dağılımları

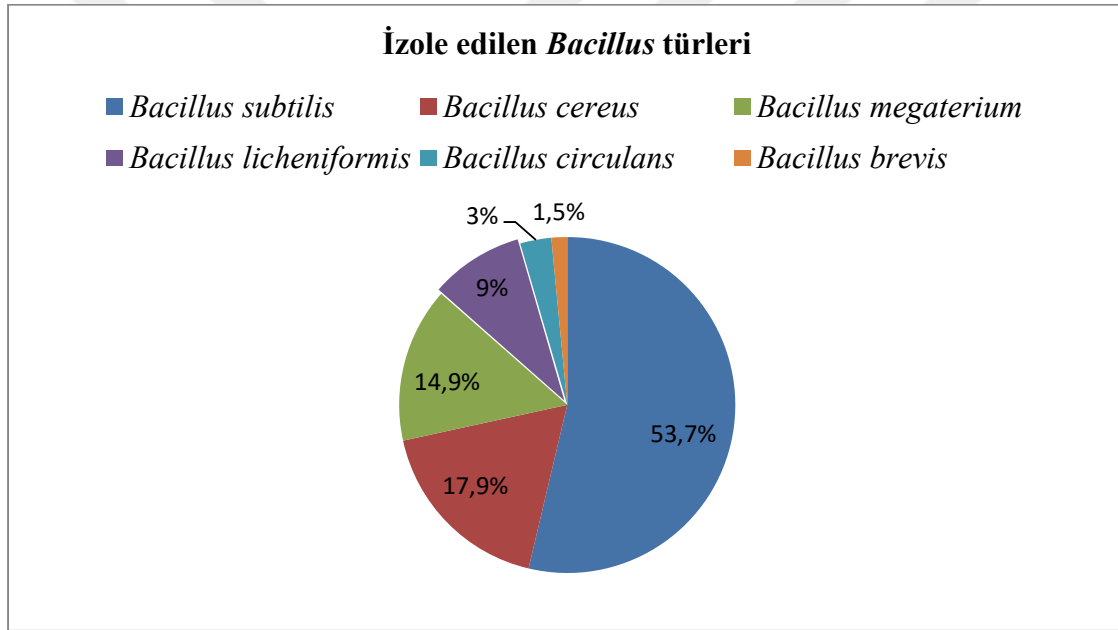
Gıda Örnekleri	Çalışılan Örnek Sayısı (n)	<i>Bacillus spp.</i> izolat Sayısı n(%)	<i>Clostridium spp.</i> İzolat Sayısı n(%)
Çiğ Süt	40	30 (75)	1 (2,5)
Peynir	40	31 (77,5)	4 (10)
Dondurma	20	6 (30)	-
Toplam	100	67 (67)	5 (5)

Not: Yüzde değerleri toplam izolat sayısına göre alınmıştır. n: İzolat sayısı

Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen ve tanımlanan *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin çalışılan örnek sayısı ve izolat sayısı çizelge 4.1'de görülmektedir. Çizelge 4.1'e göre araştırmada incelediğimiz 40 çiğ süt örneğinin 30'unda (75), 40 peynir örneğinin 31'inde (%77,5) ve 20 dondurma örneğinin 6'sında (%30) *Bacillus* türleri izole edilmiştir. İncelenen aynı örneklerde 40 çiğ süt örneğinden 1 (%2,5), 40 peynir örneğinden 4 (%10) *Clostridium* türleri izole edilmiştir.

Çizelge 4.2. İzole edilen *Bacillus* türlerinin incelenen gıda örneklerine göre dağılımları

<i>Bacillus spp.</i>	Çiğ Süt n(%)	Peynir n(%)	Dondurma n (%)	İzole Edilen <i>Bacillus spp.</i> Sayısı ve Yüzdesi
<i>B.subtilis</i>	15 (50,00)	19 (61,3)	2 (33,3)	36 (53,7)
<i>B.cereus</i>	4 (13,33)	6 (19,34)	2 (33,3)	12 (17,9)
<i>B. megaterium</i>	6 (20)	4 (12,9)	-	10 (14,9)
<i>B. licheniformis</i>	4 (13,33)	1 (3,23)	1 (16,7)	6 (9)
<i>B. circulans</i>	1 (3,33)	1 (3,23)	-	2 (3)
<i>B. brevis</i>	-	-	1(16,7)	1 (1,5)
Toplam <i>Bacillus spp.</i>	30 (100)	31(100)	6 (100)	67 (100)

Şekil 4.1. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türleri ve yüzdeleri

İzole edilen 67 *Bacillus* izolatının 36'sı (%53,7) *B. subtilis*, 12'si (%17,9) *B. cereus*, 10'u (%14,9) *B. megaterium*, 6'sı (%9) *B. licheniformis*, 2'si (%3) *B. circulans*, 1'i (%1,5) *B. brevis* olarak bulunmuştur.

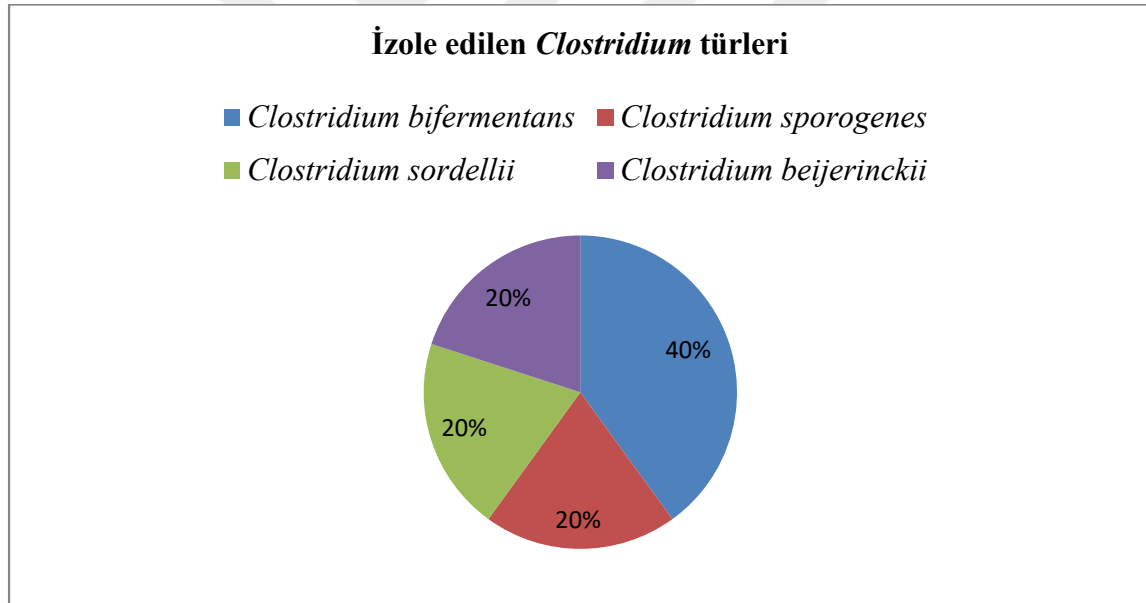
B. subtilis izolatlarının 15'i çiğ süt, 19'u peynir, 2'si dondurma örneğinde bulunurken; *B. cereus* izolatlarının 4'ü çiğ süt, 6'sı peynir, 2'si dondurma örneğinde bulunmuştur. *B. megaterium* izolatlarının 6'sı çiğ süt, 4'ü peynir örneğinde bulunurken; *B. licheniformis* izolatlarının 4'ü çiğ süt, 1'i peynir, 1'i dondurma örneğinde bulunmuştur. *B. circulans*

izolatlarının 1'i çiğ süt, 1'i peynir örneğinde bulunurken; *B. brevis* izolatlarının 1'i dondurma örneğinde bulunmuştur.

Çizelge 4.3. İzole edilen *Clostridium* türlerinin incelenen gıda örneklerine göre dağılımları

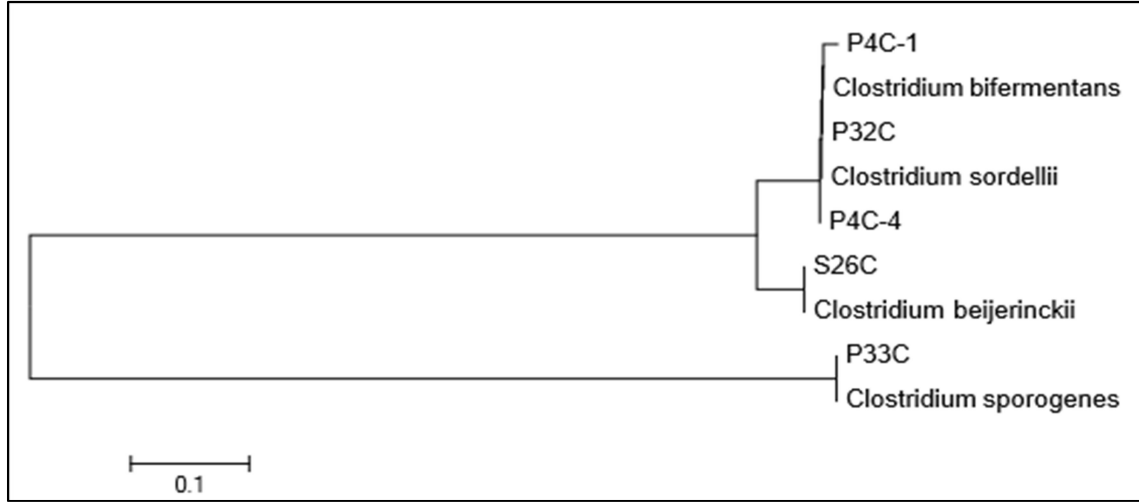
<i>Clostridium spp.</i>	Çiğ Süt n(%)	Peynir n(%)	Dondurma n(%)	İzole Edilen <i>Clostridium spp.</i> Sayısı ve Yüzdesi
<i>C. bifermentans</i>	-	2(50)	-	2(40)
<i>C. sporogenes</i>	-	1(25)	-	1(20)
<i>C. sordellii</i>	-	1(25)	-	1(20)
	1(100)	-	-	1(20)
Toplam <i>Clostridium spp.</i>	1(100)	4(100)	-	5(100)

n: İzolat sayısı



Şekil 4.2. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türleri ve yüzdeleri

Clostridium türleri sadece çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilmiştir.



Şekil 4.3. 16S rRNA gen bölgesine göre tanımlanan *Clostridium* türlerinin filogenetik ağacı

İzole edilen 5 *Clostridium* izolatının 2'si (%40) *C. bifermentans*, 1'i (%20) *C. sporogenes*, 1'i (%20) *C. sordellii*, 1'i (%20) *C. beijerinckii* olarak bulunmuştur. İzolasyonu gerçekleştirilen 5 *Clostridium* izolatının 4'ü peynirden, 1'i çiğ süttten izole edilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin 2'si *C. bifermentans*, 1'i *C. sporogenes*, 1'i *C. sordellii* olarak tanımlanırken, çiğ sütte ki izolat *C. beijerinckii* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.4. İzolasyonu gerçekleştirilen *Bacillus* türlerinin izolat numaraları ve çalışılan örneklerle göre dağılımı

Örnek Çeşiti	İzolat No	İzole Edilen <i>Bacillus</i> Türü
ÇİĞ SÜT	1. S33B-1	<i>B. licheniformis</i>
	2. S36B-1	<i>B. cereus</i>
	3. S27B-1	<i>B. subtilis</i>
	4. S39B-1	<i>B.cereus</i>
	5. S32B-1	<i>B. circulans</i>
	6. S28B-2	<i>B. subtilis</i>
	7. S38B-1	<i>B. subtilis</i>
	8. S39B-2	<i>B. subtilis</i>
	9. S28B-3	<i>B. licheniformis</i>
	10. S32B-2	<i>B.cereus</i>
	11. S31B-1	<i>B. licheniformis</i>
	12. S29B-1	<i>B. subtilis</i>
	13. S26B-1	<i>B.subtilis</i>
	14. S3B-6	<i>B. licheniformis</i>
	15. S1B-2	<i>B. megaterium</i>
	16. S13B-5	<i>B. subtilis</i>
	17. S24B-4	<i>B. subtilis</i>
	18. S12B-2	<i>B. subtilis</i>
	19. S19B-3	<i>B. subtilis</i>
	20. S12B-3	<i>B. subtilis</i>
	21. S15B-7	<i>B.megaterium</i>
	22. S2B-5	<i>B. megaterium</i>
	23. S19B-4	<i>B. subtilis</i>
	24. S14B-6	<i>B.s megaterium</i>
	25. S4B-9	<i>B.megaterium</i>
	26. S13B-4	<i>B. subtilis</i>
	27. S10B-2	<i>B. subtilis</i>
	28. S17B-2	<i>B.megaterium</i>
	29. S1B-1	<i>B. cereus</i>
	30. S24B-2	<i>B. subtilis</i>

Çizelge 4.4. (devam) İzolasyonu gerçekleştirilen *Bacillus* türlerinin izolat numaraları ve çalışılan örneklerle göre dağılımı

Örnek Çeşiti	İzolat No	İzole Edilen <i>Bacillus</i> Türü
PEYNİR	1. P33B-1	<i>B. subtilis</i>
	2. P29B-1	<i>B. subtilis</i>
	3. P35B-1	<i>B. megaterium</i>
	4. P30B-2	<i>B. subtilis</i>
	5. P29B-2	<i>B. circulans</i>
	6. P37B-1	<i>B. subtilis</i>
	7. P32B-1	<i>B. subtilis</i>
	8. P35B-2	<i>B. cereus</i>
	9. P34B-1	<i>B. cereus</i>
	10. P37B-2	<i>B. megaterium</i>
	11. P14B-6	<i>B. subtilis</i>
	12. P14B-7	<i>B. subtilis</i>
	13. P12B-2	<i>B. subtilis</i>
	14. P16B-10	<i>B. subtilis</i>
	15. P18B-2	<i>B. subtilis</i>
	16. P6B-4	<i>B. subtilis</i>
	17. P14B-8	<i>B. megaterium</i>
	18. P7B-6	<i>B. subtilis</i>
	19. P16B-12	<i>B. cereus</i>
	20. P16B-9	<i>B. subtilis</i>
	21. P13B-3	<i>B. cereus</i>
	22. P22B-5	<i>B. subtilis</i>
	23. P22B-4	<i>B. subtilis</i>
	24. P21B-3	<i>B. subtilis</i>
	25. P20B-5	<i>B. cereus</i>
	26. P2B-2	<i>B. cereus</i>
	27. P4B-1	<i>B. subtilis</i>
	28. P1B-1	<i>B. subtilis</i>
	29. P2B-3	<i>B. megaterium</i>
	30. P16B-11	<i>B. subtilis</i>
	31. P17B-14	<i>B. licheniformis</i>
DONDURMA	32. D16B-1	<i>B. brevis</i>
	33. D15B-2	<i>B. cereus</i>
	34. D14B-1	<i>B. cereus</i>
	35. D9B-6	<i>B. subtilis</i>
	36. D10B-8	<i>B. licheniformis</i>
	37. D10B-7	<i>B. subtilis</i>

Çizelge 4.5. İzolasyonu gerçekleştirilen *Clostridium* türlerinin izolat numaraları ve çalışılan örneklerle göre dağılımı

Örnek Çeşidi	İzolat No	İzole Edilen <i>Clostridium</i> Türü
ÇİĞ SÜT	1. S26C	<i>C. beijerinckii</i>
PEYNİR	2. P4C-1	<i>C. bifermentans</i>
	3. P32C	<i>C. bifermentans</i>
	4. P33C	<i>C. sporogenes</i>
	5. P4C-4	<i>C. sordellii</i>

Çalışılan peynir örneklerinde *Clostridium spp.* izole ettiğimiz izolatlardan aynı zamanda *Bacillus spp.*'de izole edilmiştir.

Çizelge 4.6. İzole edilen *Bacillus spp.* ve *Clostridium spp.* ortak izolat numaraları

İzolat numarası	<i>Bacillus spp./ Clostridium spp.</i>
P4B-1/ P4C-1	<i>B. subtilis/ C. bifermentans</i>
P32B-1/ P32C	<i>B. subtilis/ C. bifermentans</i>
P33B-1/ P33C	<i>B. subtilis/ C. sporogenes</i>
P4B-1/P4C-4	<i>B. subtilis/ C. sordellii</i>

Tanımlanması yapılan bazı *Bacillus* ve *Clostridium* türleri izolat (suş) numarası aynı olan örneklerden tespit edilmiştir

4.1. *Bacillus* spp. Mikroplate İle Biyofilm Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.7. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm oluşmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Bacillus</i> spp.	24* TSB+%1 Glukoz	Ortama değer
1. P20B-5	<i>B. cereus</i>	0,365-0,53-0,656	0,517
2. P17B-14	<i>B. licheniformis</i>	0,911-0,056-1,061	0,676
3. P12B-2	<i>B. subtilis</i>	0,106-0,045-0,076	0,076
4. D10B-8	<i>B. licheniformis</i>	0,203-0,143-0,122	0,156
5. S24B-2	<i>B. subtilis</i>	0,078-0,121-0,101	0,10
6. S3B-6	<i>B. licheniformis</i>	0,089-0,094-0,151	0,39
7. P6B-4	<i>B. subtilis</i>	0,077-0,109-0,154	0,113
8. P7B-6	<i>B. subtilis</i>	0,073-0,078-0,08	0,077
9. P4B-1	<i>B. subtilis</i>	0,756-0,71-0,784	0,75
10. P16B-11	<i>B. subtilis</i>	0,072-0,072-0,074	0,073
11. P13B-3	<i>B. cereus</i>	0,182-0,307-0,216	0,235
12. S12B-3	<i>B. subtilis</i>	0,334-0,413-0,294	0,347
13. P22B-5	<i>B. subtilis</i>	0,095-0,106-0,153	0,118
14. P14B-8	<i>B. megaterium</i>	0,217-0,36-0,306	0,294
15. S10B-2	<i>B. subtilis</i>	1,175-2,151-1,125	1,483
16. S4B-9	<i>B. megaterium</i>	0,127-0,098-0,187	0,137
17. S15B-7	<i>B. megaterium</i>	0,075-0,053-0,073	0,067
18. D10B-7	<i>B. subtilis</i>	0,133-0,143-0,132	0,136
19. S12B-2	<i>B. subtilis</i>	0,107-0,13-0,089	0,109
20. S14B-6	<i>B. megaterium</i>	0,064-0,118-0,121	0,101
21. P18B-2	<i>B. subtilis</i>	0,294-0,149-0,227	0,223
22. P14B-6	<i>B. subtilis</i>	0,504-0,383-0,728	0,538
23. S1B-1	<i>B. cereus</i>	0,088-0,078-0,079	0,082
24. S2B-5	<i>B. megaterium</i>	0,127-0,11-0,091	0,109
25. P16B-10	<i>B. subtilis</i>	0,066-0,084-0,066	0,072
26. P2B-2	<i>B. cereus</i>	0,133-0,075-0,094	0,101
27. P1B-1	<i>B. subtilis</i>	0,293-0,081-0,167	0,180
28. S19B-3	<i>B. subtilis</i>	0,218-0,246-0,272	0,245
29. S24B-4	<i>B. subtilis</i>	0,184-0,176-0,16	0,173
30. P21B-3	<i>B. subtilis</i>	0,198-0,058-0,131	0,129
31. P2B-3	<i>B. megaterium</i>	0,118-0,121-0,195	0,145
32. S19B-4	<i>B. subtilis</i>	0,888-0,797-0,936	0,874
33. D9B-6	<i>B. subtilis</i>	0,399-0,532-0,443	0,455
34. P22B-4	<i>B. subtilis</i>	0,052-0,063-0,068	0,061
35. P14B-7	<i>B. subtilis</i>	1,773-1,348-2,85	1,990
36. S13B-4	<i>B. subtilis</i>	0,066-0,155-0,138	0,119
37. P35B-2	<i>B. cereus</i>	0,08-0,067-0,064	0,070
38. P29B-1	<i>B. subtilis</i>	0,127-0,156-0,131	0,138
39. P33B-1	<i>B. subtilis</i>	0,341-0,547-0,211	0,366
40. S31B-1	<i>B. licheniformis</i>	0,06-0,052-0,065	0,059
41. P30B-2	<i>B. subtilis</i>	1,071-1,405-2,702	1,726
42. S33B-1	<i>B. licheniformis</i>	0,132-0,125-0,216	0,158
43. S39B-2	<i>B. subtilis</i>	0,086-0,069-0,111	0,089

Çizelge 4.7. (devam) Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Bacillus</i> spp.	24* TSB+%1 Glukoz	Ortama değer
44. P29B-2	<i>B. circulans</i>	0,089-0,099-0,103	0,097
45. S36B-1	<i>B. cereus</i>	0,253-0,224-0,279	0,252
46. D14B-1	<i>B. cereus</i>	0,172-0,155-0,093	0,14
47. D15B-2	<i>B. cereus</i>	0,07-0,049-0,052	0,067
48. S32B-2	<i>B. cereus</i>	0,355-0,429-0,22	0,335
49. S28B-2	<i>B. subtilis</i>	0,294-0,245-0,132	0,224
50. S26B-1	<i>B. subtilis</i>	0,116-0,194-0,137	0,149
51. S38B-1	<i>B. subtilis</i>	0,928-0,767-0,927	0,874
52. D16B-1	<i>B. brevis</i>	0,335-0,333-0,214	0,294
53. P35B-1	<i>B. megaterium</i>	0,116-0,09-0,148	0,118
54. S27B-1	<i>B. subtilis</i>	0,378-0,308-0,333	0,340
55. S32B-1	<i>B. circulans</i>	0,198-0,077-0,283	0,186
56. P37B-1	<i>B. subtilis</i>	0,061-0,065-0,065	0,063
57. S28B-3	<i>B. licheniformis</i>	0,084-0,065-0,1	0,083
58. S39B-1	<i>B. cereus</i>	0,138-0,111-0,146	0,132
59. S29B-1	<i>B. subtilis</i>	0,205-0,191-0,266	0,221
60. P37B-2	<i>B. megaterium</i>	0,167-0,159-0,194	0,173
61. P34B-1	<i>B. cereus</i>	0,427-0,371-0,37	0,389
62. P32B-1	<i>B. subtilis</i>	1,659-2,572-2,571	2,267
63. S1B-2	<i>B. megaterium</i>	0,132-0,182-0,121	0,145
64. P16B-12	<i>B. cereus</i>	0,197-0,112-0,167	0,159
65. P16B-9	<i>B. subtilis</i>	0,181-0,124-0,141	0,149
66. S13B-4	<i>B. subtilis</i>	0,063-0,087-0,091	0,080
67. S17B-2	<i>B. megaterium</i>	0,078-0,090-0,081	0,083

24*: 24 saatlik inkübasyon; TSB: Triptic Soy Broth Ort: ortalma

24 saat sonunda TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında en yüksek tutunma gösteren suşlar P32B-1, P14B-7, P30B-2, S10B-2, numaralı suşlar olarak belirlenmiştir. Bu 4 izolatın 3'ü peynir, 1'i çiğ süttten izole edilmiştir. Hepsinin de *B. subtilis* türü olduğu dikkat çekmiştir.

Bu suşların tutunma değerleri ise P32B-1'in 2,267, P14B-7'nin 1,990, P30B-2'nin 1,726, S10B-2'nin 1,483'dür.

Çizelge 4.8. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Bacillus</i> spp.	48* TSB+%1 Glukoz	Ortama değer
1. P20B-5	<i>B. cereus</i>	0,197-0,157-0,204	0,186
2. P17B-14	<i>B.licheniformis</i>	3,111-3,064-2,94	2,105
3. P12B-2	<i>B.subtilis</i>	0,243-0,076-0,167	0,162
4. D10B-8	<i>B.licheniformis</i>	0,221-0,122-0,33	0,224
5. S24B-2	<i>B.subtilis</i>	0,101-0,101-0,07	0,906
6. S3B-6	<i>B.licheniformis</i>	0,105-0,151-0,89	0,382
7. P6B-4	<i>B. subtilis</i>	0,167-0,154-0,198	0,173
8. P7B-6	<i>B.subtilis</i>	0,069-0,08-0,066	0,072
9. P4B-1	<i>B. subtilis</i>	0,386-0,384-0,286	0,865
10. P16B-11	<i>B. subtilis</i>	0,085-0,074-0,071	0,077
11. P13B-3	<i>B. cereus</i>	0,201-0,216-0,187	0,201
12. S12B-3	<i>B.subtilis</i>	0,279-0,294-0,214	0,262
13. P22B-5	<i>B. subtilis</i>	0,09-0,153-0,045	0,096
14. P14B-8	<i>B. megaterium</i>	0,204-0,306-0,211	0,240
15. S10B-2	<i>B. subtilis</i>	2,465-1,125-2,514	2,034
16. S4B-9	<i>B. megaterium</i>	0,167-0,187-0,157	0,170
17. S15B-7	<i>B. megaterium</i>	0,067-0,073-0,073	0,071
18. D10B-7	<i>B.subtilis</i>	0,157-0,132-0,17	0,153
19. S12B-2	<i>B. subtilis</i>	0,068-0,089-0,063	0,073
20. S14B-6	<i>B. megaterium</i>	0,132-0,121-0,14	0,131
21. P18B-2	<i>B. subtilis</i>	0,228-0,227-0,206	0,220
22. P14B-6	<i>B. subtilis</i>	1,936-0,728-0,883	1,182
23. S1B-1	<i>B. cereus</i>	0,131-0,079-0,177	0,129
24. S2B-5	<i>B. megaterium</i>	0,281-0,091-0,128	0,17
25. P16B-10	<i>B. subtilis</i>	0,072-0,066-0,134	0,091
26. P2B-2	<i>B. cereus</i>	0,07-0,194-0,11	0,125
27. P1B-1	<i>B. subtilis</i>	0,103-0,167-0,067	0,112
28. S19B-3	<i>B.subtilis</i>	0,181-0,172-0,176	0,176
29. S24B-4	<i>B. subtilis</i>	0,245-0,46-0,228	0,311
30. P21B-3	<i>B.subtilis</i>	0,25-0,31-0,13	0,23
31. P2B-3	<i>B. megaterium</i>	0,159-0,195-0,128	0,161
32. S19B-4	<i>B. subtilis</i>	0,108-0,136-0,078	0,107
33. D9B-6	<i>B.subtilis</i>	0,663-0,443-0,588	0,564
34. P23B-4	<i>B.subtilis</i>	0,065-0,068-0,07	0,067
35. P14B-7	<i>B. subtilis</i>	1,87-2,85-1,126	1,95
36. S13B-5	<i>B.subtilis</i>	2,17-2,138-3,258	2,522
37. P35B-2	<i>B.cereus</i>	0,074-0,064-0,057	0,065
38. P29B-1	<i>B. subtilis</i>	0,263-0,131-0,171	0,188
39. P33B-1	<i>B.subtilis</i>	0,142-0,211-0,068	0,140
40. S31B-1	<i>B.licheniformis</i>	0,077-0,065-0,047	0,063
41. P30B-2	<i>B. subtilis</i>	1,916-2,702-1,494	2,037
42. S33B-1	<i>B.licheniformis</i>	0,227-0,216-0,187	0,21
43. S39B-2	<i>B.subtilis</i>	0,076-0,111-0,063	0,083
44. P29B-2	<i>B.circulans</i>	0,228-0,103-0,15	0,160
45. S36B-1	<i>B.cereus</i>	0,295-0,279-0,213	0,262

Çizelge 4.8. (devam) Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Bacillus</i> spp.	48* TSB+%1 Glukoz	Ortama değer
46. D14B-1	<i>B.cereus</i>	0,078-0,093-0,071	0,081
47. D15B-2	<i>B.cereus</i>	0,132-0,124-0,056	0,104
48. S32B-2	<i>B.cereus</i>	0,226-0,22-0,172	0,206
49. S28B-2	<i>B.subtilis</i>	0,382-0,332-0,381	0,365
50. S26B-1	<i>B. subtilis</i>	0,078-0,137-0,073	0,096
51. S38B-1	<i>B.subtilis</i>	0,213-0,227-0,319	0,253
52. D16B-1	<i>B.brevis</i>	0,276-0,214-0,419	0,303
53. P35B-1	<i>B. megaterium</i>	0,058-0,048-0,054	0,053
54. S27B-1	<i>B.subtilis</i>	0,155-0,333-0,292	0,26
55. S32B-1	<i>B. circulans</i>	0,207-0,283-0,185	0,225
56. P37B-1	<i>B.subtilis</i>	0,064-0,065-0,061	0,063
57. S28B-3	<i>B. licheniformis</i>	0,103-0,1-0,063	0,088
58. S39B-1	<i>B. cereus</i>	0,154-0,146-0,168	0,156
59. S29B-1	<i>B.subtilis</i>	0,188-0,266-0,152	0,202
60. P37B-2	<i>B.megaterium</i>	0,237-0,194-0,302	0,244
61. P34B-1	<i>B.cereus</i>	0,147-0,197-0,233	0,192
62. P32B-1	<i>B.subtilis</i>	1,495-3,571-2,075	2,380
63. S1B-2	<i>B.megaterium</i>	0,282-0,289-0,267	0,279
64. P16B-12	<i>B.cereus</i>	0,387-0,281-0,274	0,314
65. P16B-9	<i>B.subtilis</i>	0,058-0,067-0,061	0,062
66. S13B-4	<i>B.subtilis</i>	0,982-1,228-1,011	1,074
67. S17B-2	<i>B.megaterium</i>	0,102-0,098-0,083	0,094

48*: 48 saatlik inkübasyon; TSB: Tryptic Soy Broth; Ort: ortalma

48 saat sonunda TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında en yüksek tutunma gösteren suşlar S13B-5, S13B-4, P30B-2, S10B-2, P14B-7, P14B-6, P32B-1, P17B-14 numaralı suşlar olarak belirlenmiştir. Bu 8 izolatın 5'i peynir, 3'ü çiğ süttten izole edilmiştir. Bu izolatların 7'si *B.subtilis*, 1'i *B. licheniformis*'dir. Ayrıca P30B-2, P14B-7, P32B-1 numaralı suşlar hem 24 saat hem de 48 saat sonucunda yapılan ölçümler sonucunda yüksek tutunma göstermiştir.

Çizelge 4.9. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatlarının TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat inkübasyon sonucundaki tutunma durumları

İzolat no	İzole edilen <i>Bacillus</i> spp.	24*	48*
		TSB+%1 Glukoz	TSB +%1 Glukoz
1. P20B-5	<i>B. cereus</i>	+++	++
2. P17B-14	<i>B. licheniformis</i>	+++	+++
3. P12B-2	<i>B. subtilis</i>	+	++
4. D10B-8	<i>B. licheniformis</i>	++	++
5. S24B-2	<i>B. subtilis</i>	+	+++
6. S3B-6	<i>B. licheniformis</i>	+++	+++
7. P6B-4	<i>B. subtilis</i>	+	++
8. P7B-6	<i>B. subtilis</i>	+	+
9. P4B-1	<i>B. subtilis</i>	+++	+++
10. P16B-11	<i>B. subtilis</i>	-	+
11. P13B-3	<i>B. cereus</i>	++	++
12. S12B-3	<i>B. subtilis</i>	+++	++
13. P22B-5	<i>B. subtilis</i>	+	+
14. P14B-8	<i>B. megaterium</i>	+++	++
15. S10B-2	<i>B. subtilis</i>	+++	+++
16. S4B-9	<i>B. megaterium</i>	+	++
17. S15B-7	<i>B. megaterium</i>	-	+
18. D10B-7	<i>B. subtilis</i>	+	++
19. S12B-2	<i>B. subtilis</i>	+	+
20. S14B-6	<i>B. megaterium</i>	+	+
21. P18B-2	<i>B. subtilis</i>	+	++
22. P14B-6	<i>B. subtilis</i>	+++	+++
23. S1B-1	<i>B. cereus</i>	+	+
24. S2B-5	<i>B. megaterium</i>	+	++
25. P16B-10	<i>B. subtilis</i>	-	+
26. P2B-2	<i>B. cereus</i>	+	+
27. P1B-1	<i>B. subtilis</i>	++	+
28. S19B-3	<i>B. subtilis</i>	++	++
29. S24B-4	<i>B. subtilis</i>	++	+++
30. P21B-3	<i>B. subtilis</i>	+	++
31. P2B-3	<i>B. megaterium</i>	+	++
32. S19B-4	<i>B. subtilis</i>	+++	+
33. D9B-6	<i>B. subtilis</i>	+++	+++
34. P22B-4	<i>B. subtilis</i>	-	-
35. P14B-7	<i>B. subtilis</i>	+++	+++
36. S13B-4	<i>B. subtilis</i>	+	+++

Çizelge 4.9. (devam) Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatlarının TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat inkübasyon sonucundaki tutunma durumları

İzolat no	İzole edilen <i>Bacillus</i> spp.	24*	48*
		TSB+%1 Glukoz	TSB +%1 Glukoz
37. P35B-2	<i>B.cereus</i>	-	-
38. P29B-1	<i>B.subtilis</i>	+	++
39. P33B-1	<i>B. subtilis</i>	+++	+
40. S31B-1	<i>B. licheniformis</i>	-	-
41. P30B-2	<i>B. subtilis</i>	+++	+++
42. S33B-1	<i>B. licheniformis</i>	++	+
43. S39B-2	<i>B. subtilis</i>	+	+
44. P29B-2	<i>B. circulans</i>	+	++
45. S36B-1	<i>B. cereus</i>	++	++
46. D14B-1	<i>B. cereus</i>	+	+
47. D15B-2	<i>B. cereus</i>	-	+
48. S32B-2	<i>B. cereus</i>	+++	++
49. S28B-2	<i>B. subtilis</i>	++	+++
50. S26B-1	<i>B. subtilis</i>	++	+
51. S38B-1	<i>B. subtilis</i>	+++	++
52. D16B-1	<i>B. brevis</i>	+++	+++
53. P35B-1	<i>B. megaterium</i>	++	-
54. S27B-1	<i>B. subtilis</i>	+++	++
55. S32B-1	<i>B. circulans</i>	++	++
56. P37B-1	<i>B. subtilis</i>	-	-
57. S28B-3	<i>B. licheniformis</i>	+	+
58. S39B-1	<i>B. cereus</i>	+	++
59. S29B-1	<i>B. subtilis</i>	++	++
60. P37B-2	<i>B. megaterium</i>	++	++
61. P34B-1	<i>B. cereus</i>	+++	++
62. P32B-1	<i>B. subtilis</i>	+++	+++
63. S1B-2	<i>B. megaterium</i>	++	+++
64. P16B-12	<i>B. cereus</i>	++	+++
65. P16B-9	<i>B. subtilis</i>	++	-
66. S13B-4	<i>B. subtilis</i>	+	+++
67. S17B-2	<i>B. megaterium</i>	+	+

24*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48*: 48 saatlik inkübasyon sonrası *(-); negatif, *(+); zayıf; *(++); orta, *(+++); kuvvetli

Çizelge 4.9.'de gösterilen Çiğ süt, peynir ve dondurma izole edilen *Bacillus* türlerinin tutunma dereceleri aşağıdaki formüle göre değerlendirilmiştir.

$OD \leq OD_c$	Negatif
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf
$2 \times OD_c \leq OD < 4 \times OD_c$	Orta
$4 \times OD_c < OD$	Kuvvetli

Mikroplate yönteminde 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda TSB+%1 Glukoz 'daki negatif kontrollerin ortalaması ve negatif kontrollerin standart sapması hesaplanarak OD_c belirlenmiştir.

OD_c=Negatif kontrolün OD ortalaması + 3x negatif kontrolün standart sapması

Çizelge 4.10. TSB+%1 Glukoz besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları

TSB+%1 Glukoz			
24*; ODC=0,072		48*; ODC=0,069	
OD<0,072	-	OD<0,069	-
0,072<OD≤0,144	+	0,069<OD≤0,138	+
0,144 ≤OD<288	++	0,146 ≤OD<276	++
0,288<OD	+++	0,276<OD	+++

24*, 24 saat inkübasyon; (+++) kuvvetli; (++) orta, (+) zayıf, (-) negatif, TSB: Tryptone Soya Broth, 48*, 48 saat inkübasyon; OD= optical density; ODC= cut-off OD

Çizelge 4.11. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatlarının 37 °C 'de TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat sonundaki tutunmaları ve tutunma yüzdeleri

TSB+%1 GLUKOZ								
<i>Bacillus spp.</i> (n)	24 saat n(%)				48 saat n(%)			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-
<i>B. subtilis</i> n:36	12 (33,3)	7 (19,4)	13 (36,1)	4 (11,1)	12 (33,3)	10 (27,8)	10 (27,8)	4 (11,1)
<i>B. cereus</i> n:12	3 (25)	3 (25)	4 (33,3)	2 (16,7)	1 (8,33)	6 (50)	4 (33,3)	1 (8,33)
<i>B. licheniformis</i> n:6	2 (33,3)	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)
<i>B. brevis</i> n:1	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	-	-
<i>B. megaterium</i> n:10	1 (10)	3 (30)	5 (50)	1 (10)	1 (10)	6 (60)	2 (20)	1 (10)
<i>B. circulans</i> n:2	-	1 (50)	1 (50)	-	-	2 (100)	-	-

*(-); negatif, *(+); zayıf, *(++); orta, *(+++); kuvvetli n: Test edilen suş sayısı

Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *B. subtilis*'in TSB+%1 glukoz'da 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 36 izolatin 12'si (%33,3) kuvvetli pozitif, 7'si (%19,4) orta pozitif, 13'ü (%36,1) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur. Yine *B. subtilis*'in aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 36 izolatin 12'si (%33,3) kuvvetli pozitif, 10'u (27,8) orta pozitif, 10'u (27,8) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *B. cereus*'un TSB+%1 glukoz'da 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 12 izolatin 3'ü(25) kuvvetli pozitif, 3'ü(25) orta pozitif, 4'ü (%33,3) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur. Yine *B.cereus*'un aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 12 izolatin 1'i (%8,33) kuvvetli pozitif, 6'sı(%50) orta pozitif, 4'ü (%33,3) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *B. licheniformis*'in TSB+%1 glukoz'da 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 6 izolatin 2'si (%33,3) kuvvetli pozitif, 2'si (%33,3) orta pozitif, 1'i (%16,7) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

Yine *B.licheniformis*'in aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 6 izolatin 2'si (%33,3) kuvvetli pozitif, 1'i (%16,7) orta pozitif, 2'si (%33,3) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *B. brevis*'in TSB+%1 glukoz'da 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 1 izolatin 1'i (%100) de kuvvetli pozitif bulunmuştur. Yine *B. brevis*'in aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 1 izolatin 1'i (%100) de kuvvetli pozitif bulunmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *B. megaterium*'un TSB+%1 glukoz'da 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 10 izolatin 1'i (%10) kuvvetli pozitif, 3'ü (%30) orta pozitif, 5'i (%50) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur. Yine *B. megaterium*'un aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 10 izolatin 1'i(%10) kuvvetli pozitif, 6'sı (%60) orta pozitif, 2'si (%20) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *B. circulans*'ın TSB+%1 glukoz'da 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 2 izolatin 1'i (%50) orta pozitif, 1'i (%50) zayıf

derece biyofilm pozitif bulunmuştur. Yine *B. circulans*'ın aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 2 izolatın 2'si (%100) de orta derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

4.2. *Bacillus* spp. Congo Red Agar (CRA) ile Biyofilm Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.12. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Bacillus</i> spp.	CRA'da Biyofilm Sonuçları
1. S33B-1	<i>B. licheniformis</i>	++
2. S36B-1	<i>B. cereus</i>	++
3. P33B-1	<i>B. subtilis</i>	++
4. P29B-1	<i>B. subtilis</i>	+++
5. S27B-1	<i>B. subtilis</i>	+
6. P35B-1	<i>B. megaterium</i>	++
7. S39B-1	<i>B. cereus</i>	+
8. S32B-1	<i>B. circulans</i>	++
9. P30B-2	<i>B. subtilis</i>	++
10. D16B-1	<i>B. brevis</i>	++
11. S28B-2	<i>B. subtilis</i>	+++
12. S38B-1	<i>B. subtilis</i>	+++
13. P29B-2	<i>B. circulans</i>	-
14. S39B-2	<i>B. subtilis</i>	+++
15. D15B-2	<i>B. cereus</i>	++
16. S28B-3	<i>B. licheniformis</i>	++
17. P37B-1	<i>B. subtilis</i>	+++
18. S32B-2	<i>B. cereus</i>	-
19. S31B-1	<i>B. licheniformis</i>	+++
20. P32B-1	<i>B. subtilis</i>	+
21. P35B-2	<i>B. cereus</i>	+
22. P34B-1	<i>B. cereus</i>	++
23. P37B-2	<i>B. megaterium</i>	++
24. S29B-1	<i>B. subtilis</i>	+
25. S26B-1	<i>B. subtilis</i>	++
26. D14B-1	<i>B. cereus</i>	++
27. S3B-6	<i>B. licheniformis</i>	-
28. S1B-2	<i>B. megaterium</i>	+
29. P14B-6	<i>B. subtilis</i>	+++
30. P14B-7	<i>B. subtilis</i>	-

Çizelge 4.12. (devam) Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Bacillus</i> spp.	CRA'da Biyofilm Sonuçları
31. P12B-2	<i>B. subtilis</i>	+
32. P16B-10	<i>B. subtilis</i>	-
33. P18B-2	<i>B. subtilis</i>	+
34. S13B-5	<i>B. subtilis</i>	+
35. P6B-4	<i>B. subtilis</i>	+
36. S24B-4	<i>B. subtilis</i>	++
37. S12B-2	<i>B. subtilis</i>	+
38. S19B-3	<i>B. subtilis</i>	+
39. P14B-8	<i>B. megaterium</i>	++
40. P7B-6	<i>B. subtilis</i>	+
41. S12B-3	<i>B. subtilis</i>	+
42. P16B-12	<i>B. cereus</i>	+
43. P16B-9	<i>B. subtilis</i>	++
44. P13B-3	<i>B. cereus</i>	+
45. S15B-7	<i>B. megaterium</i>	-
46. S2B-5	<i>B. megaterium</i>	+
47. P22B-5	<i>B. subtilis</i>	-
48. S19B-4	<i>B. subtilis</i>	+++
49. D9B-6	<i>B. subtilis</i>	++
50. S14B-6	<i>B. megaterium</i>	+
51. P22B-4	<i>B. subtilis</i>	-
52. S4B-9	<i>B. megaterium</i>	+
53. P21B-3	<i>B. subtilis</i>	-
54. S13B-4	<i>B. subtilis</i>	+++
55. S10B-2	<i>B. subtilis</i>	++
56. S17B-2	<i>B. megaterium</i>	+
57. P20B-5	<i>B. cereus</i>	+
58. P2B-2	<i>B. cereus</i>	-
59. P4B-1	<i>B. subtilis</i>	+++
60. P1B-1	<i>B. subtilis</i>	+++
61. P2B-3	<i>B. megaterium</i>	+
62. D10B-8	<i>B. licheniformis</i>	++
63. D10B-7	<i>B. subtilis</i>	++
64. P16B-11	<i>B. subtilis</i>	-
65. P17B-14	<i>B. licheniformis</i>	++
66. S1B-1	<i>B. cereus</i>	+
67. S24B-2	<i>B. subtilis</i>	+

Çizelge 4.13. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçlarının yüzdeleri

<i>Bacillus spp.</i> (n)	24 saat n(%)			
	+++	++	+	-
<i>B. subtilis</i> n:36	10(27,8)	8(22,2)	12(33,3)	6(16,7)
<i>B. cereus</i> n:12	-	4(33,3)	6(50)	2(16,7)
<i>B. licheniformis</i> n:6	1(16,7)	4(66,6)	-	1(16,7)
<i>B. brevis</i> n:1	-	1(100)	-	-
<i>B. megaterium</i> n:10	-	3(30)	6(60)	1(10)
<i>B. circulans</i> n:2	-	1(50)	-	1(50)

n: Test edilen suş sayısı

Bacillus izolatlarının Kongo red agara ekimi sonucu siyah renkte oluşan koloniler +++, kırmızı koloniler ++, pembe koloniler + pozitif sonuç kabul edilirken krem renkli koloniler negatif sonuç kabul edilmiştir.

Kongo red agar besiyeri kullanılarak yapılan biyofilm araştırmasında çalışılan 36 *B. subtilis* izolatının 10'u (%27,8) kuvvetli pozitif, 8'i (%22,2) orta pozitif, 12'si (%33,3) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

12 *B. cereus* izolatının 4'ü (%33,3) orta pozitif, 6'sı (%50) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

6 *B. licheniformis* izolatının 1'i (%16,7) kuvvetli pozitif, 4'ü (%66,6) orta derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

1 *B. brevis* izolatının 1'i (%100) de orta derece pozitif tutunma göstermiştir.

10 *B. megaterium* izolatının 3'ü (%30) orta pozitif, 6'sı (%60) zayıf derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

2 *B. circulans* izolatının 1'i (%50) orta derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

4.3. *Clostridium spp.* RCM ve TSB+%1 Glukoz Kullanılarak Mikroplate ile Biyofilm Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.14. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin RCM kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Clostridium spp.</i>	24* RCM	Ortalama değer
1. P4C-1	<i>C. bifermentans</i>	0,12-0,18-0,175	0,158
2. P32C	<i>C. bifermentans</i>	0,204-0,263-0,256	0,241
3. S26C	<i>C. beijerinckii</i>	0,294-0,316-0,262	0,290
4. P33C	<i>C. sporogenes</i>	0,184-0,082-0,141	0,136
5. P4C-4	<i>C. sordellii</i>	0,129-0,118-0,135	0,127

24*: 24 saatlik inkübasyon; RCM: Reinforced Clostridial Medium

Çizelge 4.15. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin RCM kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Clostridium spp.</i>	48* RCM	Ortalama değer
1. P4C-1	<i>C. bifermentans</i>	0,241-0,257-0,217	0,238
2. P32C	<i>C. bifermentans</i>	0,297-0,299-0,338	0,126
3. S26C	<i>C. beijerinckii</i>	0,556 -0,562-0,838	0,652
4. P33C	<i>C. sporogenes</i>	0,067-0,082-1,21	0,453
5. P4C-4	<i>C. sordellii</i>	0,397-0,466-0,468	0,444

48*: 48 saatlik inkübasyon; RCM: Reinforced Clostridial Medium

RCM kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonunda ki biyofilm çalışmasında tüm suşların tutunmalarında 24 saatlik ölçüme göre artış gözlemlenmiş ve tüm suşlar yüksek tutunma göstermiştir.

Çizelge 4.16. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Clostridium spp.</i>	24*	Ortalama değer
		TSB+%1 Glukoz	
1. P4C-1	<i>C. bifermentans</i>	0,197-0,183-0,229	0,203
2. P32C	<i>C. bifermentans</i>	0,32-0,497-0,627	0,48
3. S26C	<i>C. beijerinckii</i>	0,29-0,341-0,378	0,336
4. P33C	<i>C. sporogenes</i>	0,148-0,131-0,197	0,158
5. P4C-4	<i>C. sordellii</i>	0,197-0,207-0,215	0,206

24*: 24 saatlik inkübasyon; TSB: Tryptic Soy Broth

Çizelge 4.17. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucu biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin sonuçları

İzolat no	İzole edilen <i>Clostridium spp.</i>	48*	Ortalama değer
		TSB+%1 Glukoz	
1. P4C-1	<i>C. bifermentans</i>	0,39 -0,29-0,225	0,311
2. P32C	<i>C. bifermentans</i>	0,967-0,929-1,29	1,062
3. S26C	<i>C. beijerinckii</i>	0,73-0,75-0,783	0,754
4. P33C	<i>C. sporogenes</i>	0,66-0,681-0,652	0,664
5. P4C-4	<i>C. sordellii</i>	0,471-0,464-0,499	0,478

48*: 48 saatlik inkübasyon; TSB: Tryptic Soy Broth

TSB+%1 Glukoz kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon sonunda ki biyofilm çalışmasında tüm suşların tutunmalarında 24 saatlik ölçüme göre artış gözlemlenmiş ve tüm suşlar yüksek tutunma göstermiştir.

Çizelge 4.18. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* izolatlarının RCM'de 24 ve 48 saat inkübasyon sonucundaki tutunma durumları

İzolat no	İzole edilen <i>Clostridium spp.</i>	24*	48*
		RCM	RCM
1. P4C-1	<i>C. bifermentans</i>	++	++
2. P32C	<i>C. bifermentans</i>	++	+++
3. S26C	<i>C. beijerinckii</i>	+++	+++
4. P33C	<i>C. sporogenes</i>	+	+++
5. P4C-4	<i>C. sordellii</i>	+	+++

24*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48*: 48 saatlik inkübasyon sonrası *(-); negatif, *(+); zayıf, *(++); orta, *(+++); kuvvetli

Çizelge 4.19. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* izolatlarının TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat inkübasyon sonucundaki tutunma durumları

İzolat no	İzole edilen <i>Clostridium spp.</i>	24*	48*
		TSB+%1 Glukoz	TSB+%1 Glukoz
1. P4C-1	<i>C. bifermentans</i>	+	++
2. P32C	<i>C. bifermentans</i>	++	+++
3. S26C	<i>C. beijerinckii</i>	++	+++
4. P33C	<i>C. sporogenes</i>	+	+++
5. P4C-4	<i>C. sordellii</i>	+	++

24*: 24 saatlik inkübasyon sonrası, 48*: 48 saatlik inkübasyon sonrası *(-); negatif, *(+); zayıf, *(++); orta, *(+++); kuvvetli

Çizelge 4.19.'de gösterilen Çiğ süt, peynir ve dondurma izole edilen *Clostridium* türlerinin tutunma dereceleri aşağıdaki formüle göre değerlendirilmiştir.

$OD \leq OD_c$	Negatif
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf
$2 \times OD_c \leq OD < 4 \times OD_c$	Orta
$4 \times OD_c < OD$	Kuvvetli

Mikroplate yönteminde 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda TSB+%1 Glukoz 'daki ve RCM'deki negatif kontrollerin ortalaması ve negatif kontrollerin standart sapması hesaplanarak OD_c belirlenmiştir.

$$OD_c = \text{Negatif kontrolün OD ortalaması} + 3 \times \text{negatif kontrolün standart sapması}$$

Çizelge 4.20. RCM besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları

RCM			
24*; ODC=0,069		48*; ODC=0,084	
OD<0,069	-	OD<0,084	-
0,069<OD≤0,138	+	0,084<OD≤0,168	+
0,138 ≤OD<276	++	0,168 ≤OD<0,336	++
0,276<OD	+++	0,336<OD	+++

24*, 24 saat inkubasyon; (+++) kuvvetli; (++) orta, (+) zayıf, (-) negatif, RCM; Reinforced Clostridial Medium, 48*, 48 saat inkubasyon; OD= optical density; ODC= cut-off OD

Çizelge 4.21. TSB+%1 Glukoz besiyerinde spektrofotometrik biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan OD değer aralıkları

TSB+%1 Glukoz			
24*; ODC=0,14		48*; ODC=0,084	
OD<0,14	-	OD<0,142	-
0,14<OD≤0,28	+	0,142<OD≤0,284	+
0,28≤OD<0,56	++	0,284≤OD<0,568	++
0,56<OD	+++	0,568<OD	+++

24*, 24 saat inkubasyon; (+++) kuvvetli; (++) orta, (+) zayıf, (-) negatif, TSB: Tryptone Soya Broth, 48*, 48 saat inkubasyon; OD= optical density; ODC= cut-off OD

Çizelge 4.22. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* izolatlarının 37 °C'de RCM 'de 24 ve 48 saat sonundaki tutunmaları ve tutunma yüzdeleri

RCM								
<i>Clostridium spp.</i> (n)	24 saat n(%)				48 saat n(%)			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	2	-	-	-	1	1	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	1	-	-	-	1	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	1	-	1	-	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	1	-	1	-	-	-

*(-); negatif, *(+); zayıf, *(++); orta, *(+++); kuvvetli n: Test edilen suş sayısı

Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinden *C. bifermentans*'ın RCM de 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 2

izolatın 2'si de orta derece biyofilm oluşturmıştır. Aynı izolatların aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 1'i orta derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *C.beijerinckii*'nin RCM'de hem 24 hemde 48 saat inkübasyonunda kuvvetli biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir.

Aynı örneklerden izole edilen *C. sporogenes*'in RCM de 24 saat inkübasyon sonucunda zayıf biyofilm oluştururken, aynı izolat 48 saatlik inkübasyon sonucu kuvvetli biyofilm oluşturmıştır.

Aynı örneklerden izole edilen *C. sordellii*'nin RCM de 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında zayıf biyofilm oluştururken, aynı izolat 48 saatlik inkübasyon sonucu kuvvetli biyofilm oluşturmıştır.

Çizelge 4.23. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* izolatlarının 37 °C'de TSB+%1 Glukoz'da 24 ve 48 saat sonundaki tutunmaları

%1 GLİKOZ+TSB								
<i>Clostridium spp.</i>	24 saat n(%)				48 saat n(%)			
(n)	+++	++	+	-	+++	++	+	-
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	1	1	-	1	1	-	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	-	1	-	-	1	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	1	-	1	-	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	1	-	-	1	-	-

*(-); negatif, *(+); zayıf; *(++); orta, *(+++); kuvvetli n: Test edilen suş sayısı

Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinden *C. bifermentans*'ın TSB+%1 Glukoz besiyerinde 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 2 izolatın 1'i orta derece biyofilm pozitif bulunmuştur. Yine *C. bifermentans*'ın aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 2 izolatın 1'i kuvvetli pozitif, 1'i orta derece biyofilm pozitif bulunmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *C. beijerinckii*'nin TSB+%1 Glukoz besiyerinde 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 1 izolatının 1'i orta biyofilm

oluşturmuştur. Yine *C. beijerinckii*'nin aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde aynı izolat kuvvetli biyofilm oluşturmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *C. sporogenes*'in TSB+%1 Glukoz besiyerinde 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 1 izolatının 1'i zayıf biyofilm oluşturmuştur. Yine *C. sporogenes*'in aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde aynı izolat kuvvetli biyofilm oluşturmuştur.

Aynı örneklerden izole edilen *C. sordellii* 'nin TSB+%1 Glukoz besiyerinde 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 1 izolatının 1'i zayıf biyofilm oluşturmuştur. Yine *C. sordellii* 'nin aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde aynı izolat orta biyofilm oluşturmuştur.

4.4. *Clostridium* spp. Congo Red Agar (CRA) ile Biyofilm Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.24. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçları

İzolat No	<i>Clostridium</i> spp.	CRA'da Biyofilm Oluşum Dereceleri
1. P4C-1	<i>C. bifermentans</i>	-
2. P32C	<i>C. bifermentans</i>	-
3. S26C	<i>C. beijerinckii</i>	-
4. P33C	<i>C. sporogenes</i>	-
5. P4C-4	<i>C. sordellii</i>	++

Sadece *C. sordellii* izolatı CRA'da orta kuvvette biyofilm oluşturmuştur.

Çizelge 4.25. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' daki sonuçlarının yüzdeleri

<i>Clostridium</i> spp. (n)	24 saat n(%)			
	+++	++	+	-
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	-	-	2
<i>C. beijerinckii</i> n:1	-	-	-	1
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	-	1
<i>C. sordellii</i> n:1	-	1	-	-

*(-); negatif, *(+); zayıf, *(++); orta, *(+++); kuvvetli n: Test edilen suş sayısı

Clostridium izolatlarının Kongo red agara ekimi sonucu siyah renkte oluşan koloniler +++, kırmızı koloniler ++, pembe koloniler + pozitif sonuç kabul edilirken krem renkli koloniler negatif sonuç kabul edilmiştir.

Kongo red agar besiyeri kullanılarak yapılan biyofilm ölçümünde sadece *C. sordellii* türünde tutunma görülmüştür.

4.5. Enzim Aktivitesi ve Patojenite ile İlgili Yapılan Biyokimyasal Test Sonuçları

Çizelge 4.26. İzole edilen *Bacillus* türlerinin bazı enzim aktivitesi ve patojenitesine yönelik yapılan testlerin sonuçları

<i>Bacillus</i> <i>spp.</i> İzolat sayısı	Hemoliz n (%)	Siderefor n (%)	DNaz n (%)	Proteaz n (%)	Lipaz n (%)	Lesitinaz n (%)	Jelatinaz n (%)
Çiğ Süt (30)	24(80)	19(63,3)	20(66,7)	17(56,7)	25(46,7)	13(43,3)	23(76,7)
Peynir (31)	26(83,9)	20(64,5)	23(74,2)	22(71)	25(80,6)	14(45,2)	24(77,4)
Dondurma (6)	3(50)	3(50)	3(50)	4(66,7)	4(66,7)	2(33,3)	4(66,7)

Çizelge 4.27. İzole edilen *Clostridium* türlerinin bazı enzim aktivitesi ve patojenitesine yönelik yapılan testlerin sonuçları

<i>Clostridium</i> <i>spp.</i> İzolat sayısı	Hemoliz n (%)	Siderefor n (%)	DNaz n (%)	Proteaz n (%)	Lipaz n (%)	Lesitinaz n (%)	Jelatinaz n (%)
Çiğ Süt (1)	1(100)	-	-	-	-	-	1(100)
Peynir (4)	4(100)	-	-	4(100)	1(25)	3(75)	3(75)

4.5.1. Hemoliz testi sonuçları

Çizelge 4.28. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin hemoliz sonuçları

<i>Bacillus spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>B. subtilis</i> n:36	12 (80)	3(20)	16 (84,2)	3 (15,8)	2 (100)	-
<i>B. cereus</i> n:12	3 (75)	1(25)	5 (83,3)	1 (16,7)	-	2 (100)
<i>B. megaterium</i> n:10	6 (100)	-	4 (100)	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> n:6	2 (50)	2 (50)	1 (100)	-	1 (100)	-
<i>B. circulans</i> n:2	1 (100)	-	-	1 (100)	-	-
<i>B. brevis</i> n:1	-	-	-	-	-	1 (100)

Not: Yüzde değerleri her bir tür için izole edilen çiğ süt, peynir, dondurma sayısına göre verilmiştir.

Çiğ süt'den izole edilen 15 *B. subtilis* izolatının 12'si (%80), 4 *B. cereus* izolatından 3'ü (%75), 4 *B. licheniformis* izolatından 2'si (%50), *B. megaterium* ve *B. circulans* izolatlarının hepsi hemoliz pozitif bulunmuştur.

Peynir'den izole edilen 19 *B. subtilis* izolatının 16'sı (%84,2), 6 *B. cereus* izolatının 5'i (%83,3), *B. licheniformis* ve *B. megaterium* izolatlarının hepsi hemoliz pozitif bulunmuştur.

Dondurma'dan izole edilen *B. subtilis* ve *B. licheniformis* izolatlarının hepsi hemoliz pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.29. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin Hemoliz sonuçları

<i>Clostridium spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>C. bifementans</i> n:2	-	-	2	-	-	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	1	-	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	1	-	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	1	-	-	-

Çiğ süt ve peynir'den izole edilen tüm *Clostridium* türlerinde hemoliz testi sonuçları hepsinde pozitif bulunmuştur.

4.5.2. DNaz enzim testi sonuçları

Çizelge 4.30. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin DNaz sonuçları

<i>Bacillus spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>B. subtilis</i> n:36	10 (66,7)	5 (33,3)	13(68,4)	6 (31,6)	2 (100)	-
<i>B. cereus</i> n:12	1 (25)	3 (75)	5 (83,3)	1 (16,7)	-	2 (100)
<i>B. megaterium</i> n:10	6 (100)	-	4 (100)	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> n:6	2 (50)	2 (50)	1 (100)	-	1 (100)	-
<i>B. circulans</i> n:2	1 (100)	-	-	1 (100)	-	-
<i>B. brevis</i> n:1	-	-	-	-	-	1 (100)

Çiğ süt'den izole edilen 15 *B. subtilis* izolatından 10'u (%66,7), 4 *B. cereus* izolatından 1'i (%25), 4 *B. licheniformis* izolatından 2'si (%50), *B. megaterium* ve *B. circulans* izolatlarının hepsi DNaz pozitif bulunmuştur.

Peynir’den izole edilen 19 *B. subtilis* izolatının 13’ü (%68,4), 6 *B. cereus* izolatının 5’i (%83,3), *B. licheniformis* izolatlarının hepsi DNaz pozitif bulunmuştur.

Dondurma’dan izole edilen *B. subtilis* ve *B. licheniformis* izolatlarının hepsi DNaz pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.31. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin DNaz sonuçları

<i>Clostridium spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	-	-	2	-	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	-	1	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	-	1	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	-	1	-	-

İzole edilen *Clostridium* türlerinde DNaz testi sonuçları negatif bulunmuştur.

4.5.3. Proteolitik enzim aktivite testi sonuçları

Çizelge 4.32. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin Proteolitik enzim aktivite sonuçları

<i>Bacillus spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>B. subtilis</i> n:36	9 (60)	6 (40)	15 (79)	4 (21)	2 (100)	-
<i>B. cereus</i> n:12	1 (25)	3 (75)	4 (66,7)	2 (33,3)	1 (50)	1 (50)
<i>B. megaterium</i> n:10	5 (83,3)	1 (16,7)	3 (75)	1 (25)	-	-
<i>B. licheniformis</i> n:6	1 (25)	3 (75)	-	1 (100)	1 (100)	-
<i>B. circulans</i> n:2	1 (100)	-	-	1 (100)	-	-
<i>B. brevis</i> n:1	-	-	-	-	-	1 (100)

Çiğ süt'ten izole edilen 15 *B. subtilis* izolatından 9'u (%60), 4 *B. cereus* izolatından 1'i (%25), 6 *B. megaterium* izolatından 5'i (%83,3), 4 *B. licheniformis* izolatından 1'i (%25), 1 *B. circulans* izolatının 1'i proteaz pozitif bulunmuştur.

Peynir'den izole edilen 19 *B. subtilis* izolatının 15'i (%79), 6 *B. cereus* izolatının 4'ü (%66,7), 4 *B. megaterium* izolatının 3'ü (%75) proteaz pozitif bulunmuştur.

Dondurma'dan izole edilen *B. subtilis* ve *B. licheniformis* izolatlarının hepsi, 2 *B. cereus* izolatının 1'i (%50) proteaz pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.33. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin Proteolitik enzim aktivite sonuçları

<i>Clostridium spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	-	2	-	-	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	-	1	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	1	-	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	1	-	-	-

Peynir'den izole edilen *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. sordellii* izolatlarının hepsi proteaz pozitif bulunmuştur.

4.5.4. Lipolitik enzim aktivite testi sonuçları

Çizelge 4.34. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin Lipolitik enzim aktivite sonuçları

<i>Bacillus spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>B. subtilis</i> n:36	12(80)	3(20)	17(89,5)	2(10,5)	2(100)	-
<i>B. cereus</i> n:12	3(75)	1(25)	4(66,7)	2(33,3)	-	2(100)
<i>B. megaterium</i> n:10	6(100)	-	3(75)	1(25)	-	-
<i>B. licheniformis</i> n:6	3(75)	1(25)	1(100)	-	1(100)	-
<i>B. circulans</i> n:2	1(100)	-	-	1(100)	-	-
<i>B. brevis</i> n:1	-	-	-	-	1(100)	-

Çiğ süt'den izole edilen 15 *B.subtilis* izolatından 12si (%80), 4 *B. cereus* izolatından 3'ü (%75), 4 *B. licheniformis* izolatından 3'ü (%75), *B. circulans* ve *B.megaterium* izolatlarının hepsi lipaz pozitif bulunmuştur.

Peynir'den izole edilen *B.subtilis* izolatının 17'si (%89,5), 6 *B. cereus* izolatının 4'ü (%66,7), 4 *B. megaterium* izolatının 3'ü (%75), *B. licheniformis* izolatlarının hepsi lipaz pozitif bulunmuştur.

Dondurma'dan izole edilen *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. brevis* izolatlarının hepsi lipaz pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.35. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin Lipolitik enzim aktivite sonuçları

<i>Clostridium spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	-	-	2	-	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	-	1	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	1	-	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	-	1	-	-

Peynir'den izole edilen *C. sporogenes* izolatlarının hepsi lipaz pozitif bulunmuştur.

4.5.5. Fosfolipaz (Lesitinaz) enzim aktivite testi sonuçları

Çizelge 4.36. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin Fosfolipaz (Lesitinaz) enzim aktivite sonuçları

<i>Bacillus spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>B. subtilis</i> n:36	7 (46,7)	8(53,3)	9(47,4)	10(52,6)	1(50)	1(50)
<i>B. cereus</i> n:12	2(50)	2(50)	1(16,7)	5(83,3)	-	2(100)
<i>B. megaterium</i> n:10	2(33,3)	4(66,7)	2(50)	2(50)	-	-
<i>B. licheniformis</i> n:6	1(25)	3(75)	1(100)	-	1(100)	-
<i>B. circulans</i> n:2	1(100)	-	1(100)	-	-	-
<i>B. brevis</i> n:1	-	-	-	-	-	1(100)

*(-); negatif, *(+); zayıf, *(++); orta, *(+++); kuvvetli n: Test edilen suş sayısı

Çiğ süt'den izole edilen 15 *B. subtilis* izolatından 7'si (%46,7), 4 *B. cereus* izolatından 2'si (%50), 6 *B. megaterium* izolatından 2'si (%33,3), 4 *B. licheniformis* izolatından 1'i (%25), *B. circulans* izolatlarının hepsi fosfolipaz pozitif bulunmuştur.

Peynir'den izole edilen 19 *B. subtilis* izolatının 9'u (%47,4), 6 *B. cereus* izolatının 1'i (%16,7), 4 *B. megaterium* izolatının 2'si (%50), *B. licheniformis* ve *B. circulans* izolatlarının hepsi fosfolipaz pozitif bulunmuştur.

Dondurma'dan izole edilen 2 *B. subtilis* izolatının 1'i (%50), *B. licheniformis* izolatlarının hepsi fosfolipaz pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.37. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin Fosfolipaz (Lesitinaz) enzim aktivite sonuçları

<i>Clostridium spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	-	2	-	-	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	-	1	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	-	1	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	1	-	-	-

Peynir'den izole edilen *C. bifermentans* ve *C. sordellii* izolatlarının hepsi fosfolipaz pozitif bulunmuştur.

4.5.6. Jelatinaz enzim aktivite testi sonuçları

Çizelge 4.38. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin Jelatinaz enzim aktivite sonuçları

<i>Bacillus spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>B. subtilis</i> n:36	11(73,3)	4(26,7)	16(84,2)	3(16,8)	2(100)	-
<i>B. cereus</i> n:12	3(75)	1(25)	5(83,3)	1(16,7)	1(50)	1(50)
<i>B. megaterium</i> n:10	6(100)	-	2(50)	2(50)	-	-
<i>B. licheniformis</i> n:6	2(50)	2(50)	1(100)	-	1(100)	-
<i>B. circulans</i> n:2	1(100)	-	-	1(100)	-	-
<i>B. brevis</i> n:1	-	-	-	-	-	1(100)

*(-); negatif, *(+); zayıf, *(++); orta, *(+++); kuvvetli n: Test edilen suş sayısı

Çiğ süt'den izole edilen 15 *B. subtilis* izolatından 11'i (%73,3), 4 *B. cereus* izolatından 3'ü (%75), 4 *B. licheniformis* izolatından 2'si (%50), *B. megaterium* ve *B. circulans* izolatlarının hepsi jelatinaz pozitif bulunmuştur.

Peynir'den izole edilen 19 *B. subtilis* izolatının 16'sı (%84,2), 6 *B. cereus* izolatının 5'i (%83,3), 4 *B. megaterium* izolatının 2'si (%50), *B. licheniformis* izolatlarının ise hepsi jelatinaz pozitif bulunmuştur. Dondurma'dan izole edilen *B. cereus*'un 2 izolatının 1'i (%50), *B. subtilis* ve *B. licheniformis* izolatlarının hepsi jelatinaz pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.39. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin Jelatinaz enzim aktivite sonuçları

<i>Clostridium spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	-	2	-	-	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	1	-	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	-	1	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	1	-	-	-

Peynir'den izole edilen *C. bifermentans* ve *C. sordellii*; çiğ süttten izole edilen *C. beijerinckii* izolatlarının hepsi jelatinaz pozitif bulunmuştur.

4.5.7. Siderefor aktivitesi testi sonuçları

Çizelge 4.40. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin Siderefor aktivite sonuçları

<i>Bacillus spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>B. subtilis</i> n:36	12 (80)	3 (20)	11 (57,9)	8 (42,1)	2 (100)	-
<i>B. cereus</i> n:12	-	4(100)	4 (66,7)	2 (33,3)	-	2 (100)
<i>B. megaterium</i> n:10	6 (100)	-	3 (75)	1 (25)	-	-
<i>B. licheniformis</i> n:6	1 (25)	3 (75)	1 (100)	-	1 (100)	-
<i>B. circulans</i> n:2	-	1 (100)	1 (100)	-	-	-
<i>B. brevis</i> n:1	-	-	-	-	-	1(100)

Çiğ süt'ten izole edilen 15 *B. subtilis* izolatından 12'si (%80), 4 *B. licheniformis* izolatından 1'i (%25), *B. megaterium* izolatlarının hepsi siderefor pozitif bulunmuştur.

Peynir'den izole edilen 19 *B. subtilis* izolatının 11'i (%57,9), 6 *B. cereus* izolatının 4'ü (%66,7), 4 *B. megaterium* izolatının 3'ü (%75), *B. licheniformis* ve *B. circulans* izolatlarının hepsi siderefor pozitif bulunmuştur.

Dondurma'dan izole edilen *B. subtilis* ve *B. licheniformis* izolatlarının hepsi siderefor pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.41. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Clostridium* türlerinin Siderefor aktivite sonuçları

<i>Clostridium spp.</i> (n)	Çiğ süt n(%)		Peynir n(%)		Dondurma n(%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>C. bifermentans</i> n:2	-	-	-	2	-	-
<i>C. beijerinckii</i> n:1	-	1	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i> n:1	-	-	-	1	-	-
<i>C. sordellii</i> n:1	-	-	-	1	-	-

Çiğ süt ve peynirden izole edilen *Clostridium* türlerinin siderefor aktivitesi negatif bulunmuştur.

4.6. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Çalışmamızda çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen 67 *Bacillus spp.* için duyarlılık-dirençlilik durumları Kirby-Baur disk difüzyon yöntemi ile yapılarak National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de belirtilen antibiyotik inhibisyon zon çap ölçümleri belirtilen esaslara göre değerlendirilmiştir [109]. Test sonuçları duyarlı (S), orta (intermediate, I) veya dirençli (R) olarak belirtilir, S, belirtilen etkene bağlı olan enfeksiyonun, denenen ilacın uygun dozları ile tedavi edilebileceğini gösterir, I, MİK değerlerinin ilacın doku veya kan düzeylerine yakın olduğunu belirtir. Bu tip ilaçlar fizyolojik olarak konsantre edildikleri vücut bölgelerindeki enfeksiyonların tedavisinde

kullanılabilirler. R, bu izolatların ilacın normal sistemik düzeyleri ile inhibe edilemeyeceğini gösterir.

Çizelge 4.42. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus spp.* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Kullanılan Antibiyotik	Penisilin (P)	Ampisilin (AMP)	Eritromisin (E)	Amikasin (AK)	Kloramfenikol (C)	Vankomisin (VA)	Tetrasiklin (TE)	Basitrasin (B)	Novobiyocin (N)
İzolot No	S $\geq$ 22 I 12-21 R $\leq$ 11	S $\geq$ 29 I 21-28 R $\leq$ 20	S $\geq$ 18 I 14-17 R $\leq$ 13	S $\geq$ 17 I 15-16 R $\leq$ 14	S $\geq$ 18 I 13-17 R $\leq$ 12	S $\geq$ 12 I 10-11 R $\leq$ 9	S $\geq$ 19 I 15-18 R $\leq$ 14	S $\geq$ 13 I 9-12 R $\leq$ 8	S $\geq$ 22 I 18-21 R $\leq$ 17
1. S33B-1	S	R	S	S	S	S	S	I	S
2. S36B-1	R	R	I	S	S	S	S	R	R
3. P33B-1	S	I	S	S	S	S	S	R	I
4. P29B-1	R	R	I	S	S	I	I	R	R
5. S27B-1	R	R	R	S	S	S	S	R	R
6. P35B-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7. S39B-1	R	R	R	S	S	R	S	R	R
8. S32B-1	S	R	S	S	S	S	S	I	I
9. P30B-2	I	R	S	S	I	S	S	I	I
10. D16B-1	R	R	R	I	R	S	R	I	R
11. S28B-2	R	R	R	S	S	R	S	R	R
12. S38B-1	I	R	S	S	S	R	I	R	R
13. P29B-2	R	R	R	S	S	R	R	R	R
14. S39B-2	R	R	R	S	S	R	S	R	R
15. D15B-2	I	R	S	S	S	S	S	R	S
16. S28B-3	R	R	S	S	S	S	S	R	R
17. P37B-1	R	R	I	S	I	S	R	I	R
18. S32B-2	R	R	R	S	S	R	S	R	R
19. S31B-1	R	R	I	S	S	S	S	R	R
20. P32B-1	R	R	I	S	S	S	S	I	I
21. P35B-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22. P34B-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
23. P37B-2	R	R	R	S	S	I	R	I	R
24. S29B-1	R	R	R	S	R	S	R	S	S
25. S26B-1	I	R	R	S	I	S	R	I	I
26. D14B-1	S	R	I	S	S	S	S	S	S
27. S3B-6	R	R	S	S	S	S	S	R	R
28. S1B-2	I	I	I	S	S	I	S	R	R
29. P14B-6	R	R	R	S	S	I	S	R	R
30. P14B-7	R	I	R	I	S	I	I	R	R

Çizelge 4.42. (devam) Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Kullanılan Antibiyotik	Penisilin (P)	Ampisilin (AMP)	Eritromisin (E)	Amikasin (AK)	Kloramfenikol (C)	Vankomisin (VA)	Tetrasiklin (TE)	Basitrasin (B)	Novobiyocin (N)
İzolat No	S≥22 I 12-21 R≤11	S≥29 I 21-28 R≤20	S≥18 I 14-17 R≤13	S≥17 I 15-16 R≤14	S≥18 I 13-17 R≤12	S≥12 I 10-11 R≤9	S≥19 I 15-18 R≤14	S≥13 I 9-12 R≤8	S≥22 I 18-21 R≤17
31. P12B-2	R	I	I	S	S	S	S	R	R
32. P16B-10	R	R	I	I	S	S	I	R	R
33. P18B-2	I	R	R	S	I	S	S	R	R
34. S13B-5	R	I	R	S	S	S	I	R	R
35. P6B-4	R	R	I	S	I	S	I	R	R
36. S24B-4	R	R	R	S	S	S	S	R	R
37. S12B-2	R	I	R	I	S	I	I	R	R
38. S19B-3	I	R	R	S	S	S	S	R	R
39. P14B-8	R	R	S	S	I	R	I	R	R
40. P7B-6	R	R	I	S	S	I	S	R	R
41. S12B-3	I	R	R	I	S	S	S	R	R
42. P16B-12	R	R	I	S	S	S	S	R	R
43. P16B-9	R	R	R	S	I	S	S	R	R
44. P13B-3	R	R	R	S	S	I	S	R	I
45. S15B-7	S	S	S	S	R	S	S	I	R
46. S2B-5	S	I	S	S	R	I	S	S	R
47. P22B-5	R	I	R	S	S	S	I	R	R
48. S19B-4	R	R	R	I	S	S	S	R	R
49. D9B-6	I	R	R	I	S	S	S	R	R
50. S14B-6	S	S	S	S	S	I	R	I	R
51. P22B-4	R	I	R	S	I	I	S	R	R
52. S4B-9	S	I	S	S	S	S	R	I	R
53. P21B-3	I	R	R	I	S	S	S	R	R
54. S13B-4	R	R	R	S	S	I	S	R	R
55. S10B-2	R	I	R	I	S	S	S	R	R
56. S17B-2	R	R	R	S	S	I	R	I	R
57. P20B-5	R	R	R	S	S	I	S	R	R
58. P2B-2	R	I	R	S	S	S	I	R	R
59. P4B-1	S	S	I	S	S	S	S	I	S
60. P1B-1	S	I	S	R	S	S	I	R	I
61. P2B-3	R	R	R	S	S	I	I	I	R
62. D10B-8	R	R	I	S	S	S	S	R	R
63. D10B-7	R	R	R	S	S	S	S	I	R
64. P16B-11	R	I	R	I	S	S	I	R	R
65. P17B-14	R	R	S	S	S	S	S	R	R
66. S1B-1	R	R	S	S	I	S	R	R	R
67. S24B-2	R	R	R	S	S	S	S	R	R

Çizelge 4.43. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus spp.* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları ve yüzdeleri

Antibiyotikler	<i>Bacillus spp.</i> n:67		
	S n(%)	I n (%)	R n (%)
Penisilin (P)	12(17,9)	10(14,9)	45(67,2)
Ampisilin (AMP)	5(7,5)	14(20,9)	48(71,6)
Eritromisin (E)	18(26,9)	14(20,9)	35(52,2)
Amikasin (AK)	55(82,1)	10(14,9)	2(3)
Kloramfenikol (C)	53(79,1)	9(13,4)	5(7,5)
Vankomisin (VA)	45(67,2)	15(22,4)	7(10,4)
Tetrasiklin (TE)	43(64,2)	13(19,4)	11(16,4)
Basitrasin (B)	5(7,5)	15(22,4)	47(70,1)
Novobiosin (N)	7(10,4)	7(10,4)	53(79,2)

Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen 67 *Bacillus* türü için 12'si (%17,9) penisilin, 5'i (%7,5) ampisilin, 18'i (%26,9) eritromisin, 55'i (%82,1) amikasin, 53'ü (%79,1) kloramfenikol, 45'i (%67,2) vankomisin, 43'ü (%64,2) tetrasiklin, 5'i (%7,5) basitrasin, 7'si (%10,4) novobiosin antibiyotiklerine karşı duyarlı bulunurken; 45'si (%67,2) penisilin, 48'i (%71,6) ampisilin, 35'i (%52,2) eritromisin, 2'si (%3) amikasin, 5'i (%7,5) kloramfenikol, 7'si (%10,4) vankomisin, 11'i (%16,4) tetrasiklin, 47'si (%70,1) basitrasin, 53'ü (%79,2) novobiosin antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuştur.

Çizelge 4.44. İzole edilen *Bacillus* türlerinin bazı antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç (R) sayısı ve yüzdeleri

<i>Bacillus</i> türlerinin antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin sayısı ve yüzdeleri	<i>B.subtilis</i> n:36	<i>B.cereus</i> n:12	<i>B.licheniformis</i> n:6	<i>B.brevis</i> n:1	<i>B.megaterium</i> n:10	<i>B.circulans</i> n:2
Penisilin (P)	25(69,4)	9(75)	5(83,3)	1(100)	1(10)	1(50)
Ampisilin (AMP)	25(69,4)	10(83,3)	6(100)	1(100)	4(40)	2(100)
Eritromisin (E)	24(66,7)	6(50)	-	1(100)	3(30)	2(100)
Amikasin (AK)	1(2,8)	1(8,3)	-	-	-	-
Kloramfenikol (C)	-	1(8,3)	-	1(100)	2(20)	-
Vankomisin (VA)	3(8,3)	3(25)	-	-	1(10)	1(50)
Tetrasiklin (TE)	3(8,3)	2(16,7)	-	1(100)	4(40)	1(50)
Basitrasin (B)	28(77,8)	10(83,3)	5(83,3)	-	2(20)	2(100)
Novobiosin (N)	29(80,5)	8(66,7)	5(83,3)	1(100)	8(80)	2(100)

Çizelge 4.45. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *B. subtilis*'in antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve yüzdeleri

Antibiyotikler	<i>B.subtilis</i> n:36		
	S n(%)	I n (%)	R n (%)
Penisilin (P)	3(8,3)	8(22,2)	25(69,4)
Ampisilin (AMP)	1(2,8)	10(27,8)	25(69,4)
Eritromisin (E)	4(11,1)	8(22,2)	24(66,7)
Amikasin (AK)	26(72,2)	9(25)	1(2,8)
Kloramfenikol (C)	30(83,3)	6(16,7)	-
Vankomisin (VA)	26(72,2)	7(19,4)	3(8,3)
Tetrasiklin (TE)	23(63,9)	10(27,8)	3(8,3)
Basitrasin (B)	2(5,6)	6(16,7)	28(77,8)
Novobiosin (N)	2(5,6)	5(13,9)	29(80,5)

Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen 36 *B.subtilis* türü için 3'ü (%8,3) penisilin, 1'i (%2,8) ampisilin, 4'ü (%11,1) eritromisin, 26'sı (%72,2) amikasin, 30'u (%83,3) kloramfenikol, 26'sı (%72,2) vankomisin, 23'ü (%63,9) tetrasiklin, 2'si (%5,6) basitrasin, 2'si (%5,6) novobiosin antibiyotiklerine karşı duyarlı bulunurken 25'si (%69,4)

penisilin, 25'i (%69,4) ampisilin, 24'i (%66,7) eritromisin, 1'si (%2,8) amikasin, 3'si (%8,3) vankomisin, 3'i (%8,3) tetrasiklin, 28'si (%77,8) basitrasin, 29'ü (%80,5) novobiosin antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuştur.

Çizelge 4.46. Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *B. cereus*'un antibiyotik duyarlılık test sonuçları ve yüzdeleri

Antibiyotikler	<i>B.cereus</i> n:12		
	S n(%)	I n (%)	R n (%)
Penisilin (P)	2(16,7)	1(8,3)	9(75)
Ampisilin (AMP)	1(8,3)	1(8,3)	10(83,3)
Eritromisin (E)	3(25)	3(25)	6(50)
Amikasin (AK)	11(91,7)	-	1(8,3)
Kloramfenikol (C)	10(83,3)	1(8,3)	1(8,3)
Vankomisin (VA)	7(58,3)	2(16,7)	3(25)
Tetrasiklin (TE)	9(75)	1(8,3)	2(16,7)
Basitrasin (B)	2(16,7)	-	10(83,3)
Novobiosin (N)	3(25)	1(8,3)	8(66,7)

Çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen 12 *B. cereus* türü için 2'si (%16,7) penisilin, 1'i (%8,3) ampisilin, 3'ü (%25) eritromisin, 11'i (%91,7) amikasin, 10'u (%83,3) kloramfenikol, 7'si (%58,3) vankomisin, 9'u (%75) tetrasiklin, 2'si (%16,7) basitrasin, 3'ü (%25) novobiosin antibiyotiklerine karşı duyarlı bulunurken; 9'u (%75) penisilin, 10'u (%83,3) ampisilin, 6'sı (%50) eritromisin, 1'i (%8,3) amikasin, 1'i (%8,3) kloramfenikol, 3'ü (%25) vankomisin, 2'si (%16,7) tetrasiklin, 10'u (%83,3) basitrasin, 8'i (%66,7) novobiosin antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuştur.



5. TARTIŞMA

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan süt ve süt ürünleri, hijyenik koşullarda üretilmediği, saklanmadığı ve gerekli kontrollerinin yapılmaması durumunda insan sağlığı açısından zararlı olabilmektedirler.

Bacillus ve *Clostridium* cinsi mikroorganizmalar habitatları toprak olması nedeniyle doğada çok yaygın olarak bulunurlar. Süt ve süt ürünlerinde bozulma başta olmak üzere gıda zehirlenmesine de neden olmaları sebebi ile süt endüstrisinde önemli bir yere sahiptirler. Bu bakterilerin sporları pastörize sütlerde canlı olarak kalabildiklerinden oda sıcaklıklarında bozulmalara neden olur. Pastörizasyon mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesinde en etkili yöntemlerden biri olup, süt hijyenini sağlayan bir yöntemdir. Süte uygulanan pastörizasyon işlemi aktif olarak laktik asit üreten birçok bakteriyi öldürür, ancak ısı direnci yüksek olan sporlu bakteriler canlılıklarını korurlar [15].

Çiğ sütün kalitesi bileşim ve hijyen özelliklerine göre değerlendirilir. Çiğ sütün hijyen kalitesini etkileyen faktörler; çiğ sütte bulunan mikroorganizma sayısı ve mikroorganizma türüdür. Çiğ sütün sağımdan hemen sonra işlenmesi gerekir, sağımdan sonra hemen işlenmediği durumlarda ise (+4 ve +5 °C) soğukta saklanması gerekir. Hammaddenin kalitesini tehdit eden en önemli unsurlardan biri enzimatik faaliyetlerdir. Enzimatik faaliyetler sonucunda çiğ sütte asitlik artışı, yapıda denatürasyon, tatlı pıhtılaşma ve tat değişiklikleri meydana gelir. Bu nedenle çalışmamızda süt endüstrisinde ekonomik kayıplara ve gıda zehirlenmelerine sebebiyet vermesi nedeni ile sporlu bakterilerden *Bacillus* ve *Clostridium*’ların bulunma sıklığı ile birlikte biyofilm oluşumu, antibiyotik duyarlılığı, DNaz aktivitesi, Hemoliz, Siderefor, Proteolitik enzim aktivitesi, lipolitik enzim aktivitesi, Fosfolipaz (lesitinaz) enzim aktivitesi, jelatinaz enzim aktivitesi araştırılmıştır.

Bacillus cinsi bakteriler kontamine olduklarında gıdalarda sahip oldukları enzimlerle gıdaların kalitesini olumsuz etkileyerek bozulmalara neden olurlar. Bu cins içerisinde en sık besin zehirlenmesine neden olan tür *B. cereus*’dur. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*’de gıda zehirlenmelerine neden olan türler arasındadır. *B. subtilis* subtilin adlı bir bakteriyosin üreterek bozulmalara neden olur [4].

Clostridium 'lar taze yeşil otlarda, kuru otlarda, yemlerde, toprakta ve hayvan dışkılarında bulunurlar. *C. tyrobutyricum* sert peynirlerde geç şişmeye neden olan bir bakteridir. Bu tip bozulma daha çok pastörize sütlerden yapılan peynirlerde görülmektedir. *C. sporogenes* sert peynirlerde beyaz çürüme denilen bozulma meydana getirmektedir. Böyle peynirlerin gıda zehirlenmelerine yol açtığı bilinmektedir [110].

İncelediğimiz gıda örneklerinden toplam 67 *Bacillus spp.* izole edilmiştir. 40 süt örneğinden 30 (%44,8), 40 peynir örneğinden 31 (%46,3), 20 dondurma örneğinden de 6 (%8,9) *Bacillus* türleri izole edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Yapılan tanımlamalar da 67 *Bacillus* izolatlarının 36'sı (%53,7) *B. subtilis*, 12'si (%17,9) *B. cereus*, 10'u (%14,9) *B. megaterium*, 6'sı (%9) *B. licheniformis*, 2'si (%3) *B. circulans*, 1'i (%1,5) *B. brevis* olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.). 40 süt örneğinden izole edilen 30 (%44,8) *Bacillus* izolatının 15'i (%50) *B. subtilis*, 4'ü (%13,33) *B. cereus*, 6'sı (%20) *B. megaterium*, 4'ü (%13,33) *B. licheniformis*, 1'i (%3,33) *B. circulans* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.2.). 40 peynir örneğinden izole edilen 31 (%46,3) *Bacillus* izolatının 19'u (%61,3) *B. subtilis*, 6'sı (%19,34) *B. cereus*, 4'ü (%12,9) *B. megaterium*, 1'i (%3,23) *B. licheniformis*, 1'i (%3,23) *B. circulans* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.2.). 20 dondurma örneğinden izole edilen 6 (%8,9) *Bacillus* izolatının 2'si (%33,3) *B. subtilis*, 2'si (%33,3) *B. cereus*, 1'i (%16,7) *B. licheniformis*, 1'i (%16,7) *B. brevis* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.2.).

Yıbar ve arkadaşlarının (2017) Bursa ilinde çeşitli süt ve peynir örneklerinde *B. cereus*'un insidansını, enterotoksin üretimini ve antibiyotik direncini araştırmışlar. Bu amaçla toplam 259 adet çiğ süt, pastörize süt, UHT süt ve peynir örneği analiz edilmiş. 259 örneğin 26'sında (%10,04) *B. cereus* kontaminasyonu tespit edilmiş olup, bu izolatın 13'ünde (%68,4) NHE (non hemolitik enterotoksin) toksini, 6'sında (%31) NHE ve HBL(hemolizin BL) toksini pozitif bulunmuştur. İzolatların hepsi eritromisin ve streptomisine duyarlı olmalarına rağmen penisilin G'ye dirençli olduğu tespit edilmiştir [111]. Bizim çalışmamızda *B. cereus* %17,9 oranında bulunurken, izolatlarımızın %50'sinin eritromisine, %75'inin penisiline dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Fernandes ve arkadaşlarının (2014) Ricotta peynirlerinden izole ettikleri *B. cereus* türlerinin biyofilm oluşumu, antimikrobiyal duyarlılığı, enterotoksijenik özelliklerini

incelemişler. Araştırmacılar *B. cereus*'u çevresel örneklerde (kalıp, pres, saklama kutusu, paketlenme masası ve peynir altı suyu kanalizasyon tahliyesi), hammadde olarak kullanılan çeşitli örneklerden izole etmişlerdir. Toplamda 42 *B. cereus* izolatının % 38,1 hemolitik ve % 92,9 non-hemolitik enterotoxin geni bulunmuş. Tüm isolatlar ampisilin, penisilin ve trimetoprim için dirençli, eritromisine'de % 9,5' dirençli bulunmuşlardır [112]. Bizim çalışmamızda ise çiğ süt örneklerinden izole edilen *B. cereus* izolatlarının %75'i, peynir örneklerinden izole ettiğimiz *B. cereus* izolatlarının %83,3'ü hemoliz pozitif bulunmuştur. Araştırmada izole ettiğimiz *B. cereus* izolatlarının %83,3'ü ampisilin'e, %75'i penisilin'e ve %50'si eritromisin'e dirençli bulunmuştur.

2012 yılında Seda Teke Gündüz tarafından Ankara ilinde yapılan bir çalışmada 50 çiğ süt örneğinden 109 *Bacillus spp.* izole edilmiştir. *Bacillus* türleri biyokimyasal testlere göre adlandırılmıştır. Buna göre; 22'si (%20,2) *B. subtilis*, 20'si (%18,4) *B. brevis*, 14'ü (%12,8) *B. macerans*, 11'i (%10,1) *B. licheniformis*, 6'sı (%5,5) *B. coagulans*, 5'i (%4,6) *B. polymyxa*, 4'ü (%3,7) *B. stearothermophilus*, 2'si (%1,8) *B. cereus*, 1'i, (%0,9) *B. pumilus*, 1'i (%0,9) *B. megaterium*, 1'i (%0,9) *B. lentus* olarak tanımlanırken 22 (%20,2) tür adlandırılmamıştır [119]. Bizim araştırmamızda incelemiş olduğumuz 40 çiğ süt örneğinden 15'i (%50) *B. subtilis*, 4'ü (%13,33) *B. cereus*, 6'sı (%20) *B. megaterium*, 4'ü (%13,33) *B. licheniformis*, 1'i (%3,33) *B. circulans* izole edilmiştir. Her iki çalışmada da en fazla *B. subtilis* en fazla izole edilen tür olarak dikkatleri çekmektedir.

Hindistanın Mumbai kentinde (2010) açık da ve paketlenmiş olarak satılan dondurmelerde psikrotrof *B. cereus* bakterisine rastlanmıştır. Açık da satılan dondurmelerde paketlenmiş dondurmalarla göre *B. cereus*'un varlığının daha sık olduğu gözlemlenmiştir [113].

De Jonghe ve arkadaşlarının (2010) yapmış oldukları çalışmada bazı *Bacillus* türlerinin (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa* ve *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* ve *B. usiformis*) proteolitik aktivitelerini araştırmışlar. Ayrıca *B. subtilis*, *B. pumilus* ve *B. amyloliquefaciens* türlerinin lipolitik aktivitelerini araştırmışlar.

B. polyxxa'nın lesitinaz aktivitesine bağlı olarak pastörize sütün içinde bir 'parçalı krema' kusuruna neden olduğu ayrıca *B. cereus*'un da bu enzimi ürettiği ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada emetik toksinden başka ısıya dayanıklı sitotoksik maddeleri *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis*, ısıya dayanıksız sitotoksik maddeleri ise

B. amyloliquefaciens, *B. subtilis*, *B. pumilus* ve *B. cereus* türlerinin ürettiği bulunmuş [114]. *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* türlerinin proteolitik aktivite göstermesi bizim araştırmamızda da gözlemlenmiştir. Çiğ süt örneklerinden izole ettiğimiz *Bacillus* türlerinin proteolitik ve lipolitik enzim aktivitesi sırasıyla *B. subtilis*'de (%60-%80), *B. cereus*'de (%25-%25), *B. megaterium*'da (%83,3-%100), *B. licheniformis*'de (%25-%75), *B. circulans*'da (%100-%100) olarak bulunmuştur. *B. subtilis*'e yapılan çalışmalarda sıklıkla rastlanması sütlerde parçalı krema denilen kusura bu bakterinin sebep olabileceğini desteklemiştir.

Molva ve ark. (2009) İzmir (Türkiye)'de yaptıkları bir araştırmada inceledikleri 100 peynir örneğinden 6 *B. cereus* ve 22 *B. thuringiensis* türlerini izole etmişler. Araştırmacılar bu türlerin biyokimyasal özelliklerini, ekstraselüler enzim üretimini ve enterotoksijenik gen yapılarını incelemişler. *B. thuringiensis* suşlarının kristal morfolojileri, faz kontrast mikroskobu ile sferik veya küresel ve düzensiz şekilli bulunmuş. *B. cereus* ve *B. thuringiensis* suşlarının ekstraselüler enzimler ürettiği bulunmuş. Bu ekstraselüler enzimler ise; jelatinaz (%83 - %91), DNaz (%83 - %77), lesitinaz (%83 - %95), yağsız süt agarında proteaz (% 100-% 100), süt agarında proteaz (%100-%91), kazein agarda proteaz (%83-%77), ksilanaz (%100-%45) ve selülaz (%0-%41), ve amilaz (%83-%27) olarak belirlenmiştir [115]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada incelediğimiz peynir örneklerinden sadece *B. cereus* izole edilmiştir. Bu türün proteaz, lipaz ve fosfolipaz enzim aktiviteleri araştırılmış. 6 *B. cereus* suşunun 4'ü (%66,7) proteaz pozitif, 4'ü (%66,7) lipaz pozitif, 1'i (%16,7) fosfolipaz (lesitinaz) pozitif bulunmuştur.

Iurlina ve ark. (2006) Arjantin'de 279 farklı gıda örneğinde *Bacillus* türleri varlığını araştırmışlar. İnceledikleri 50 peynir örneğinin 15'inde, analizi yapılan tüm örneklerin ise %38'inde *Bacillus* türlerine rastlanmıştır [116]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmadan ise incelediğimiz 40 peynir örneğinin 31'inde (%77,5) *Bacillus spp.* izole edilmiş olup, bu izolatların 19'u *B. subtilis*, 6'sı *B. cereus*, 4'ü *B. megaterium*, 1'i *B. licheniformis*, 1'i *B. circulans* olarak tanımlanmıştır.

Çin'in Wuhan kentinde 2006 yılında marketlerden ilkbaharda ve sonbaharda kartonda paketlenmiş pastörize edilmiş tam yağlı süt örnekleri çalışılmış. Araştırmacıların izole ettikleri 102 *Bacillus* izolatının 92'sinin *B. cereus*, 9'unun *B. thuringiensis* ve 1'inin de

B. mycoides olarak belirlenmiştir [83]. Bizim çalışmamızda ise sadece çiğ süt örneklerinde *B. cereus* %13,33, çalışılan tüm örneklerde %17,9 izole edilmiştir.

Schlegelova ve arkadaşlarının (2003) yapmış oldukları çalışmada gıda örneklerinde *B. cereus* izole edip, antimikrobiyal dirençliliklerini araştırmışlardır. *B. cereus* 'un % 31'ini süt ürünlerinden, % 28'ini et ürünlerinden izole etmişlerdir. *B. cereus*'un hemen hemen hepsi ampicilin, cephalothin, ve oxacillin karşı duyarlılık gösterirken, streptomisin dirençli olduğu tespit edilmiştir [102]. Bizim çalışmamızda ise *B. cereus* çiğ sütte %13,33, peynirde %19,34, dondurmada %33,3 oranında tespit edilmiştir. Bu türün basitrasin ve ampicilin'e %83,3 dirençli olduğu bulunmuştur.

Cosentino ve arkadaşlarının (1997) İtalya'da süt ve süt ürünlerinde ki *Bacillus* florasının varlığını araştırmak amacıyla yapmış oldukları çalışmada 90 adet pastörize, 60 adet UHT ve 228 adet peynir örneği olmak üzere toplamda 378 örnek kullanmışlardır. 378 örneğin 278'inde (%70) *Bacillus* türleri olduğu tespit edilmişlerdir. Bunlardan 90 tanesini *B. cereus* olarak tanımlamışlardır [117]. Bizim araştırmamızda ise en sık izole edilen tür *B. subtilis* olarak belirlendi.

Bacillus ve *Clostridium* cinsi bakterilerin sporları hidrofiliktirler ve kolayca çelik, cam ve lastik yüzeylere yapışırlar ve yüzeylerdeki kısa temizleme işlemleri bütün sporları elemine etmeyebilir. Sporlar sütte ısıl aktivasyonda hızlıca çimlenip, uygun koşullar bulup çoğaldıklarında, oluşturdukları biyofilm formunda elemine edilmeleri son derece zordur.

Antar ve arkadaşları (2016) bir süt işletmesinde paslanmaz çelik borularda RAPD tekniği ile yapılan bir çalışmada 55 farklı *Bacillus* suşu tespit edilmiştir. Bu izolatların biyofilm oluşturma özelliklerini araştırmışlar. Bu yöntem ile izole edilen 5 *B. cereus* izolatının 3'ünün biyofilm özelliğinin negatif olduğu, 2'sinin de zayıf derecede biyofilm yaptığı gözlemlenmiştir [126]. Bizim çalışmamızda ise çiğ süt, peynir ve dondurma örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinden *B. cereus*'un TSB+%1 glukoz'da 24 saat inkübasyon sonucunda tutunmalarına bakıldığında 12 izolatın %25'inin kuvvetli, %25'inin orta, %33,3'ünün zayıf biyofilm yaptığı tespit edilmiştir. Yine *B. cereus*'un aynı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonucu incelendiğinde 12 izolatın %8,33'ünün kuvvetli, %50'sinin orta, %33,33'ünün zayıf biyofilm yaptığı tespit edilmiştir.

Araştırmamızda incelediğimiz örneklerden 5 *Clostridium spp.* izole edilmiştir. 40 çiğ süt örneğinden 1 (%20), 40 peynir örneğinden 4 (%80) izole edilmiştir (Çizelge 4.1.). Çiğ süt örneğinden izole edilen 1 *Clostridium* izolatının 1'i (%100) *C. beijerinckii* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3.).

Peynir örneğinden izole edilen 4 *Clostridium* izolatının 2'si (%50) *C. bifermentans*, 1'i (%25) *C. sporogenes*, 1'i (%25) *C. sordellii* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3.).

Yapılan çeşitli çalışmalarda bazı *Clostridium* türleri sert peynirin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir. *C. tyrobutyricum*, *C. sporogens*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* daha az sıklıkla *C. cochlearium*, *C. perfringens*, *C. septicum* türleri bulunmuştur [118].

Chaturvedi ve arkadaşlarının (2015) Hindistan'da toplam 200 örnekte (çiğ süt, lor peyniri, peynir ve paneer (hint usulü peynir) örnekleri ile yapmış oldukları bir çalışmada, *Clostridium* türlerinin varlığı araştırmışlar. Toplam 200 örneğin 62'sinde (%31) *Clostridium* türleri izole edilmiş ve bu izolatların 22'si (%35,48) *C. perfringens*, 21'i (%33,87) *C. sporogens*, 12'si (%19,35) *C. butyricum* ve 7'si (%11,29) *C. tyrobutyricum* olarak tanımlanmıştır. Bu araştırmada süt ve süt ürünlerinden izole edilen *Clostridium* türlerinden çoğunluğunun *C. perfringens* olduğu gözlemlenmiştir [119]. Bizim araştırmamızda ise incelediğimiz 40 peynir örneğinden toplam 4 izolat elde edilmiştir. Bunlardan 2'si *C. bifermentans*, 1'i *C. sordellii*, 1'i *C. sporogens* olarak tanımlanmıştır. Çalışılan 40 çiğ süt örneğinden yalnız 1 izolat *C. beijerinckii* olarak bulunmuştur.

Gaya ve arkadaşlarının (2011) inceledikleri laktat-fermente edici clostridial sporların varlığını 55 süt fabrikasından topladıkları, 194 adet koyun sütünde ve 57 Manchego peynirinde *Clostridium spp.*'nin varlığını araştırmışlar. Analiz edilen süt örneklerinin %97'sinde *Clostridium* sporları tespit edilmiş. Sporların yaz sütlerinde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Peynirlerden elde edilen 223 *Clostridium* izolatında; *C. sporogens* %78,9, *C. beijerinckii* %10,3, *C. tyrobutyricum* %9,0 ve *C. butyricum* %1,8 türleri tespit edilmiştir [128]. Bizim yaptığımız çalışmada ise *C. beijerinckii* türüne çiğ süt örneğinde, *C. sporogens* türüne de peynirden izole edilmişlerdir.

Lycken ve Borch araştırmacılarının 2006 yılında yapmış oldukları çalışmalarında, inceledikleri 223 Manchego peynirinde 223 *Clostridium* izolatı tanımlanmıştır. Bu

izolatlarda (%78,9) *C. sporogenes*, (%10,3) *C. beijerinckii*, (%9,0) *C. tyrobutyricum*, (%1,8) *C. butyricum* tespit edilmiştir [120]. Bizim çalışmamızda ise 4 *Clostridium* izolatından; (%20) *C. sporogenes*, (%20) *C. sordellii* ve (%40) *C. bifermentans* türleri peynirden, (%20) *C. beijerinckii* süttten izole edilmiştir.

Turci ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada 2014 sonbahar-2015 yaz'a kadar Grosseto'da (Toskana, İtalya) toplanan 527 koyun sütünde izole edilen *Clostridium* türlerinin sonbahar ve yaz aylarında spor konsantrasyonlarının kış ve ilkbahar mevsimlerine göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada en muhtemel sayım yöntemi (EMS) sonucu 77 pozitif süt örneği bulunmuştur. Bu 77 pozitif tüpten 222 izolat elde edilmiş ve PCR'a tabii tutulmuştur. 77 pozitif tüpten EMS pozitif 63 örneğin tanımlanması sağlanmış, aynı örnekten çıkan ve aynı türe ait olan izolatlar klonlar olarak kabul edilmiştir. PCR ile tanımlanan *Clostridium* türleri *C. perfringens* 35'i (%56), *C. sporogenes* 28'i (%44), *C. tyrobutyricum* 5'i (%7,9), *C. butyricum* 1'i (%1,6) ve *C. beijerinckii* 1'i (%1,6) olarak tanımlanmıştır [121].

ABD'de 2009-2010'da tanımlanmış 1527 gıda kaynaklı salgında en sık izole edilen mikroorganizmalar arasında 57 *C. perfringens* vakasına rastlanmıştır.

Çeşitli süt ürünleri üzerinde yapılan bir çalışmada 260 örnekden 7'sinde *C. botulinum* sporuna rastlanmıştır. 7 *C. botulinum* izolatının 5'i mozzarella peynirinden, 1'i yumuşak peynirden, 1'i de işlenmiş peynirden izole edilmiştir. Çiğ süt, pastörize süt, tereyağ, ricotta peyniri, pıhtılaşmış süt, süt kremasında *Clostridium* türüne rastlanmamıştır [122].

163 süt örneğinde yapılan bir çalışmada 20 dondurma örneğinden 4 *C. perfringens* izole edilmiştir [123]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise incelediğimiz dondurma örneklerinde *Clostridium* türlerine rastlanılmamıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Süt ve süt ürünlerinde *Bacillus* ve *Clostridium* 'lar sporları ile ısısal gibi çevresel etkilere dayanıklı hale geldiğinden enzimleri, toksinleriyle gıda zehirlenmesi başta olmak üzere, renk, tat, koku gibi değişmelere yol açarlar. İnsanlara çiğ süt ve çiğ süttten elde edilen ürünlerin tüketilmesi yoluyla bulaşan bu bakteriler insanlarda sağlık sorunlarına yol açabilirken aynı zaman da gıda endüstrisinde ekonomik kayıplara sebebiyet verdiklerinden dolayı oldukça önem arz ederler.

Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre insanların en önemli besin kaynağını oluşturan süt ve süt ürünleri florasında *Bacillus* ve *Clostridium* türlerine rastlanmıştır. İzole ettiğimiz *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerin göstermiş oldukları bazı enzim aktiviteleri süt teknolojileri açısından dikkate değerdir. Enzim aktivitelerinin yüksek olması, kalite kayıplarının en aza indirilmesi için mandralardan toplanan sütlerin sanitasyon kurallarına uyularak süt işleme tesislerine getirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Pastörizasyon ve UHT mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesinde en etkili önlemlerin birisi olup süt hijyenini sağlayan bir uygulamadır. Ancak bu yöntemlerle sütlerde kontaminant bakterilerin çoğu uzaklaştırılsa bile bu bakterilerin enzimleri sorunlara yol açabilmektedir. Özellikle süt ve süt ürünlerinde bulunan bakterilerin insan sağlığına zarar vermemesi için sütün yeterli sıcaklıkta pastörize edilmesi ve ürünlerin pastörize süt kullanılarak üretilmesi gerekir. Çiğ sütte veya düşük sıcaklıkta yetersiz pastörizasyon uygulanmış sütte bulunabilecek bakterilerden korunmanın en etkili yolu açıkta satılan süt ve süt ürünlerinin mümkün olduğunca alınmaması, UHT veya pastörize süt tüketilmesi önerilmektedir. Aynı zamanda süt ve süt ürünlerinin saklanma koşullarının, ambalajlarının bozulmamış olmasına da dikkat edilmelidir.

Yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamızda ki bulgulara göre süt florasında ki bakterilerin antibiyotik direnci yüksek oranda çıkmıştır. Bu durum bize süt ve süt ürünlerinin tüketilmesiyle, antibiyotiklere direnç gösteren bakterilerin insanlara geçebileceğini göstermektedir. Bakterilerin antibiyotiklere dirençli olması da bakteriyel enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır.

Çalıştığımız gıda örneklerinde sporlu bakterilerden *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerin baskın olarak bulunması çalışılan örneklerin kirli şekilde sağıldığı, üretildiği, bu bakterilerin sporlu olmaları sebebiyle çevre koşullarına dayanıklı olduğu ya da yeteri kadar hijyen kurallarına uyulmadığını düşündürmüştü ve halk sağlığı açısından riskli olduğu kanısını ortaya çıkarmıştır.

Araştırmamızda *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinde patojeniteyi belirleyen çeşitli kriterlerin belirlenmesi bu bakterilerin oluşturabileceği enfeksiyonların şiddeti, mücadelesi ve konak-patojen ilişkisi hakkında bilgi vermektedir.

Günümüzde ticari amaçlı gıda üretimi yapan işletmelerin etkili HACCP sistemleri, iyi üretim uygulamaları ve iyi hijyen uygulamaları gibi sistemlerin uygulaması, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonları minimum seviyeye indirirken aynı zamanda kalite güvencesi sağlamaktadır. Süt endüstrisinde termizasyon, pastörizasyon, UHT, mikrofiltrasyon ve baktöfugasyon, uygulanan bu teknolojik işlemlerdendir.

Sonuç olarak *Bacillus* ve *Clostridium* gibi sporlu bakteriler, sporları ile süt ve süt ürünlerinde pastörizasyona ve çeşitli işlemlere karşı dayanıklılık gösterip bulunabilmektedir. Bu nedenle işletmelerde, üretim yerlerinde gerekli hijyen, sanitasyon kurallarına dikkat edilmeli ve gıdalar uygun koşullarda saklanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Kılıç, S. (2010). *Süt mikrobiyolojisi*. İzmir: Sidas Yayınları, 643.
2. Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kämpfer, P., Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T. and Scoging, A. C. (1999). Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4637–4645.
3. Kaynar, P. (2011). Ülkemiz peynirleri üzerine mikrobiyolojik araştırmalar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 41(1), 1–8.
4. Lindström, M. and Korkeala, H. (2006). Laboratory diagnostics of botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 19(2), 298–314.
5. Sağlam, D. ve Şeker, E. (2016). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 9(2), 105–113.
6. Yoon, Y., Lee, S., and Choi, K.-H. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, 201–215.
7. Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999–1007.
8. Uraz, G. and Gündüz, S. T. (2013). Investigation of the presence of biofilm in *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus* which are isolated from raw milks. *Current Opinion in Biotechnology*, (24), 101–102.
9. Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., & Garde, S. (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a lactobacillus reuteri adjunct. *Food Microbiology*, 42, 82–88.
10. Gokoz, M. (2016). *Proteazın Fazla Üretimi için UV Mutasyon Yoluyla Bacillus subtilis Strain 168 E6-5’de Suş Geliştirme Çalışmaları ve Üreme Ortamının Optimizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 1-16.
11. Kalkan, S., ve Halkman, K. (2006). *Bacillus cereus* ve içme sütünde oluşturduğu sorunlar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(1), 1–11.
12. Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S. and Balasubramanian, T. (2011). Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant α -amylase from *Bacillus cereus*. *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), 424–429.
13. Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I. and Chambliss, G. H. (1998). *Bacillus*. *Systematic Bacteriology*. Arnold Press, London, 709–720.
14. Kalaylı, E. ve Beyatlı, Y. (2003). *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA’ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(12), 24-35.

15. Alebouyeh, M., Orimi, P. G., Azimi-Rad, M., Tajbakhsh, M., Tajeddin, E. and Sherafat, S. J. (2011). Fatal sepsis by *Bacillus circulans* in an immunocompromised patient. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(3), 156.
16. Rathi, P., Saxena, R. K. and Gupta, R. (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37(2), 187–192.
17. Topuz, U., Kıran, Ö. E. ve Çömlekçioğlu, U. (2007). Selüloz üreticisi *Bacillus* suşlarının enzimatik özelliklerinin araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 10(2), 13-16.
18. Berkeley, R. C. W. and Logan, N. A. (1997). *Bacillus alicyclobacillus* and *Paenibacillus*. In *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, 184–204.
19. Doğanay, M. and Aydın, N. (1991). Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 23(3), 333–335.
20. Gündüz, S. (2012). *Çiğ Sütten İzole Edilen Bacillus'ların Adlandırılması ve Biyofilm Varlığının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-110.
21. Hijyen, T. (2016). Olgu sunumu; Yanıkta izole edilen *Bacillus licheniformis*. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(3), 267-270.
22. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P. and Merkl, R. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 204–211.
23. Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 514–525.
24. Sneath, P. H. A. (1986). Endospore-forming gram-positive rods and cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, 1104–1207.
25. Perez, A. R., Abanes-De Mello, A. and Pogliano, K. (2000). SpoIIB localizes to active sites of septal biogenesis and spatially regulates septal thinning during engulfment in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 1096–1108.
26. Morikawa, M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1), 1–8.
27. Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (1998). *Gıda Mikrobiyolojisi*, (1. Baskı). İzmir: Mengi Tan Basımevi, 134–136.
28. Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B. and Brözel, V. S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4970–4977.

29. Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4), 324–338.
30. Kaleli, D., ve Özkaya, F. (2000). *Bacillus cereus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara: Sim Matbaacılık, 395–401.
31. Wijnands, L. M., Dufrenne, J. B., Zwietering, M. H., and Van Leusden, F. M. (2006). Spores from mesophilic *Bacillus cereus* Strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 120–128.
32. Svensson, B., Eneroth, Å. S. A., Brendehaug, J., Molin, G. and Christiansson, A. (2000). Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. *Journal of Dairy Research*, 67(3), 455–460.
33. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., and Tenover, F. C. (1999). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press.
34. Guo, M., Hao, G., Wang, B., Li, N., Li, R., Wei, L. and Chai, T. (2016). Dietary administration of *Bacillus subtilis* enhances growth performance, immune response and disease resistance in Cherry Valley ducks. *Frontiers in microbiology*, 7, 1975.
35. Vary, P. S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.-D. and Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5): 957–967.
36. Logan, N. A., Old, D. C. and Dick, H. M. (1985). Isolation of *Bacillus circulans* from a wound infection. *Journal of Clinical Pathology*, 38(7), 838.
37. Miller, R. A., Kent, D. J., Watterson, M. J., Boor, K. J., Martin, N. H. and Wiedmann, M. (2015). Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8492–8504.
38. Aydın, M., (1997). *Anaerobes*, Adana: Özak Matbaası, 1-123.
39. Topçu, A. W., Söyletir, G. ve Doğanay, M. (2017). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 4. Baskı, 1-2384.
40. Gündem, N. S. (2010). *Antibiyotikle İlişkili İshal Olgularında Clostridium difficile'nin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Konya, 1-51.
41. Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 16–34.
42. Bano, L., Tonon, E., Drigo, I., Pirazzini, M., Guolo, A., Farina, G. and Montecucco, C. (2018). Detection of *Clostridium tetani* neurotoxins inhibited in vivo by botulinum antitoxin b: potential for misleading mouse test results in food controls. *Toxins*, 10(6), 248.

43. McCollum, D. L. and Rodriguez, J. M. (2012). Detection, Treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(6), 581–592.
44. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., Başustaoğlu, A. C., Yıldiran, Ş. T., Tanyüksel, M. ve Yapar, M. (2010). *Tıbbi mikrobiyoloji*. İzmir: Atlas Kitapçılık, 6. Baskı, 1-964.
45. Qureshi, N., and Ezeji, T. C. (2008). Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(4), 319–330.
46. Giamarellou, H. (2000). Anaerobic infection therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16(3), 341–346.
47. Brunt, J., Cross, K. L. and Peck, M. W. (2015). Apertures in the *Clostridium sporogenes* spore coat and exosporium align to facilitate emergence of the vegetative cell. *Food Microbiology*, 51, 45–50.
48. Cato, E. P., George, W. L., and Finegold SPI. (1986), Genus *Clostridium*. In: *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, 2, 1141–1200.
49. O'brien, R. W. and Morris, J. G. (1971). Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology*, 68(3), 307–318.
50. Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M. and Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on pcr and dgge to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1): 83–91.
51. Edagiz, S., Lagace-Wiens, P., Embil, J., Karlowsky, J. and Walkty, A. (2015). Empyema caused by *Clostridium bifermentans*: A case report. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 26(2), 105–107.
52. Erol İ (2007). *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Ankara: Pozitif Matbaacılık, 1. Baskı, 126-144.
53. London, J. (1991). Bacterial Adhesins. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 26, 239–247.
54. Telli, A. E. ve Doğruer, Y. (2013). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerde patojeniteye genel bakış. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 51–59.
55. Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S. and Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host and Microbe*, 5(6), 580–592.
56. Carrique-Mas, J. J. and Bryant, J. E. (2013). A Review of foodborne bacterial and parasitic zoonoses in vietnam. *Ecohealth*, 10(4), 465–489.
57. Kotiranta, A., Lounatmaa, K. and Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2(2), 189–198.

58. Poxton, I. R. (2006). Other *Clostridium spp.*, *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, 2, 567–574.
59. Sobel, J., Malavet, M. and John, S. (2007). Outbreak of clinically mild botulism type e illness from home-salted fish in patients presenting with predominantly gastrointestinal symptoms. *Clinical Infectious Diseases*, 45(2), 14–16.
60. Sobel, J., Tucker, N., Sulka, A., McLaughlin, J. and Maslanka, S. (2004). Foodborne botulism in the United States, *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1606.
61. Halkman, A. K. (2013). *Gıda Mikrobiyolojisi II Ders Notları*. Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
62. Baysallar, M. (2011). Botulizm ve Tanısal Yaklaşım. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 10(3).
63. Čapek, P. and Dickerson, T. J. (2010). Sensing the deadliest toxin: technologies for botulinum neurotoxin detection. *Toxins*, 2(1), 24–53.
64. Sobel, J. (2005). Botulism. *Clinical Infectious Diseases*, 41(8), 1167–1173.
65. Shapiro, R. L., Hatheway, C. and Swerdlow, D. L. (1998). Botulism in the United States: A clinical and epidemiologic review. *Annals of Internal Medicine*, 129(3), 221–228.
66. Rood, J. I. and Cole, S. T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews*, 55(4), 621–648.
67. Andersson, A., Ronner, U. and Granum, P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 145–155.
68. Seyitoğlu, Ş., Cengiz, Ş., Altun, S., Küçükkalem Ö.F., Sözdutmaz, İ., (2012). Erzurum yöresinde koyunlarda *Clostridium perfringens* toksin varlığının toksin nötralizasyon, elisa ve lateks aglütinasyon test yöntemleri ile araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 23, 39-43.
69. Bilgehan, H. (1986). *Klinik Mikrobiyoloji*. İzmir: Bilgehan Basımevi, 2. Baskı, 137–140.
70. Brown, K. L. (2000). Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin*, 56(1): 158–171.
71. Ray, B. and Bhunia, A. (2008). Foodborne infections. *Fundamental Food Microbiology*, 283–313.
72. Çil, G. İ., ve Ormancı, F. S. B. (2016). Piliç boyun derilerinden izole edilen *C. perfringens*’lerin antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(2), 93-97.

73. Novak, J. S. and Juneja, V. K. (2002). *Clostridium perfringens*: Hazards in new generation foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 127–132.
74. Brynestad, S. and Granum, P. E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 74(3), 195–202.
75. Urschel, J. D. (1999). Necrotizing soft tissue infections. *Postgraduate Medical Journal*, 75(889), 645–649.
76. Titball, R. W. (2005). Gas gangrene: an open and closed case. *Microbiology*, 151(9): 2821–2828.
77. Mellata, M., Ameiss, K., Mo, H. and Curtiss, R. (2010). Characterization of the contribution to virulence of three large plasmids of avian pathogenic *Escherichia coli* 7122 (O78: K80: H9). *Infection and Immunity*, 78(4), 1528–1541.
78. Flores-Díaz, M. and Alape-Girón, A. (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase-c in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon*, 42(8): 979–986.
79. Asha, N. J. and Wilcox, M. H. (2002). Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, 51(10), 891–894.
80. Modi, N. and Wilcox, M. H. (2001). Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *Journal of Clinical Pathology*, 54(10), 748–751.
81. Sparks, S. G., Carman, R. J., Sarker, M. R. and McClane, B. A. (2001). Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in north america. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 883–888.
82. Songer, J. G. (2010). Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 399–404.
83. Zhou, G., Liu, H., He, J., Yuan, Y. and Yuan, Z. (2008). The occurrence of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* in chinese pasteurized full fat milk. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 195–200.
84. Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623.
85. Mah, T.-F. C. and O'toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39.
86. Shemesh, J., Henschke, C. I., Shaham, D., Yip, R., Farooqi, A. O., Cham, M. D. and Libby, D. M. (2010). Ordinal scoring of coronary artery calcifications on low-dose ct scans of the chest is predictive of death from cardiovascular disease. *Radiology*, 257(2), 541–548.
87. Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D. and Tonks, N. K. (1997). Development of “Substrate-Trapping” mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5), 1680–1685.

88. Sharma, M., and Anand, S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry—a case. *Food Control*, 13(6–7), 469–477.
89. Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L. P. and Lochs, H. (2005). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3380–3389.
90. Fite, A., Macfarlane, S., Furrie, E., Bahrami, B., Cummings, J. H., Steinke, D. T. and Macfarlane, G. T. (2013). Longitudinal analyses of gut mucosal microbiotas in ulcerative colitis in relation to patient age and disease severity and duration. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3), 849–856.
91. Donelli, G., Vuotto, C., Cardines, R. and Mastrantonio, P. (2012). Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65(2), 318–325.
92. Feldmeier, H., Heukelbach, J., Eisele, M., Sousa, A. Q., Barbosa, L. M. M. and Carvalho, C. B. M. (2002). Bacterial superinfection in human tungiasis. *Tropical Medicine & International Health*, 7(7), 559–564.
93. Sharp, R., & Macfarlane, G. T. (2000). Chemostat enrichments of human feces with resistant starch are selective for adherent butyrate-producing clostridia at high dilution rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4212–4221.
94. Woods, J., Boegli, L., Kirker, K. R., Agostinho, A. M., Durch, A. M., deLancey Pulcini, E. and James, G. A. (2012). Development and application of a polymicrobial, in vitro, wound biofilm model. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 998–1006.
95. Chen, L., Daniel, R. M. and Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255–275.
96. Oliveira, R. B. A., Margalho, L. P., Nascimento, J. S., Costa, L. E. O., Portela, J. B., Cruz, A. G. and Sant’Ana, A. S. (2016). Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 11–19.
97. Shah, N. P. (2000). Effects of milk-derived bioactives: An overview. *British Journal of Nutrition*, 84, 3–10.
98. Akçelik, M., Ayhan, K. ve Çakır, İ. (2000). *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, (2), Ankara: Sim Matbaacılık Ltd. Şti., 329-334.
99. Gürsoy, O. ve Kesenkaş, H. (2011). *Peynir Biliminin Temelleri*, İzmir: Sidas Yayınları, 79–110.
100. Aureli P, Franciosa G, Scalfaro C. (2011). *Clostridium spp.*. In: *Encyclopedia of dairy sciences*, 2(4), 47-53.

101. Altun, B., Besler, T. ve Ünal, S. (2002). Ankara’da satılan sütlerin değerlendirilmesi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 11(2), 45–55.
102. Schlegelova, J., Babak, V., Brychta, J., Klimova, E. and Napravnikova, E. (2003). The prevalence of and resistance to antimicrobial agents of *Bacillus cereus* isolates from foodstuffs. *Veterinarni Medicina-Czech*, (11), 331–338.
103. Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J. A. and Griffiths, M. W. (1998). Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 159–171.
104. Akarca, G. ve Kuyucuoğlu, Y. (2015). Afyonkarahisar piyasasında satılan dondurmaların mikrobiyolojik kalitesi üzerinde çalışmalar. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 91–104.
105. Inal, T. (1990). *Süt ve süt ürünleri hijyen ve teknolojisi*. İstanbul: Final Ofset, 1-1109.
106. Alichanidis, E. (2007). Cheeses ripened in brine. *Cheese Problems Solved*, 330-342.
107. Seçkin, A. K. ve Baladura, E. (2010). Gıdaların muhafazasında bakteriyosin ve bakteriyofaj uygulamaları. *Gıda*, 35 (6), 461-467.
108. Turan, M. K., Günay, Ö. C., Kayış, S. A. ve Çörtük, M. (2018). Mikrobiyotada 16S rRNA ve basit biyoinformatik analizler. *Journal Of Biotechnology And Strategic Health Research*, 2(1), 23–34.
109. CLSI, (2009). Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility tests, *Clinical and Laboratory Standarts Intitute*.
110. Yaygın, H. (1989). Peynirlerde görülen geç şişmeye karşı lysosym kullanılması. *Gıda Dergisi*, 14(6), 337-341.
111. Yibar, A., Cetinkaya, F., Soyutemiz, E. and Yaman, G. (2017). Prevalence, enterotoxin production and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from milk and cheese. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 23, 635–642.
112. Fernandes, M. S, Fujimoto, G., Schneid, I., Kabuki, D. Y. and Kuaye, A. Y. (2014). Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. *International Dairy Journal*, 38(1), 16–23.
113. Warke, R., Kamat, A., Kamat, M. and Thomas, P. (2000). Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, India. *Food Control*, 11(2), 77–83.
114. De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L. and Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 318–325.

115. Molva, C., Sudagidan, M. and Okuklu, B. (2009). Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. *Food Control*, 20(9), 829–834.
116. Iurlina, M. O., Saiz, A. I., Fuselli, S. R. and Fritz, R. (2006). Prevalence of *Bacillus spp.* in different food products collected in Argentina. *LWT-Food Science and Technology*, 39(2), 105–110.
117. Cosentino, S., Mulargia, A. F., Pisano, B., Tuveri, P. and Palmas, F. (1997). Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 38(2–3), 235–238.
118. Le Bourhis, A.-G., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R. and Tholozan, J.-L. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 154–163.
119. Chaturvedi, A. and Shukla, S. (2015). Occurrence of *Clostridium* Species in different dairy products and its associated health risk. *International Journal of Recent Scientific Research*, 2, 2827–2829.
120. Lycken, L. and Borch, E. (2006). Characterization of *Clostridium spp.* isolated from spoiled processed cheese products. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1887–1891.
121. Turchi, B., Pero, S., Torracca, B., Fratini, F., Mancini, S., Galiero, A. and Cerri, D. (2016). Occurrence of *Clostridium spp.* in ewe's milk: enumeration and identification of isolates. *Dairy Science and Technology*, 96(5), 693–701.
122. Franciosa, G., Pourshaban, M., Gianfranceschi, M., Gattuso, A., Fenicia, L., Ferrini, A. M. and Aureli, P. (1999). *Clostridium botulinum* spores and toxin in mascarpone cheese and other milk products. *Journal of Food Protection*, 62(8): 867–871.
123. El-Bassiony, T. A. (1980). Occurrence of *Clostridium perfringens* in milk and dairy products. *Journal of Food Protection*, 43(7), 536–537.
124. Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M. and Garde, S. (2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 70–75.
125. Gleeson, D., O'Connell, A., and Jordan, K. (2013). Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 217–227.
126. Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B. and Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science and Technology*, 96(1), 27–38.
127. Hammond, E. N., Donkor, E. S. and Brown, C. A. (2014). Biofilm formation of *Clostridium difficile* and susceptibility to manuka honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 329.

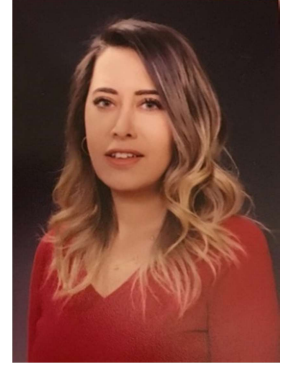
128. Garde, S., Arias, R., Gaya, P. and Nuñez, M. (2011). Occurrence of *Clostridium spp.* in Ovine milk and manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal*, 21(4), 272–278.
129. Klijn, N., Nieuwenhof, F. F., Hoolwerf, J. D., Van Der Waals, C. B. and Weerkamp, A. H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8): 2919–2924.
130. Özdingiş, A. G. (2017). *Su Sümülü ve Diğer Lignoselülozik Atıkların Kullanımıyla İkinci Nesil Biyoetanol Üretimi*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1-143.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : MEMİŞ, Pınar
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 06.05.1991, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : (0536) 680 88 88
 e-mail : pinarm-91@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı	2013
Lise	Ankara Cumhuriyet Lisesi	2009

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Memiş, P. ve Yücel, N. (2016). *Çiğ Süt, Peynir ve Dondurma Örneklerinden İzole Edile Sporlu Bakterilerin Virülans Özelliklerinin İncelenmesi*. I. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi'nde sunulmuş poster, Antalya.

Proje

1. Memiş, P., *Süt ve Süt Ürünlerinden Sporlu Bakterilerin İzolasyonu ve Patojenite Kriterlerinin İncelenmesi*, Bilimsel Araştırma Projesi-Yüksek Lisans, 05/2016-06,(13.491 TL), 2016-2019

Hobiler

Doğa yürüşleri, pilates, yüzme, fotoğraf çekmek



GAZİ GELECEKTİR..