

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENTEROTOKSİJENİK *BACILLUS CEREUS*' UN
ÇİĞ KÖFTEDE ENTEROTOKSİN
OLUŞTURMA YETENEĞİNİN BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim

Sevda PEHLİVANLAR

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

138213

DANIŞMAN

Doç. Dr. U. Tansel ŞİRELİ

2003 - ANKARA


**T.C. YUKSEĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 21.02.2003


Prof. Dr. Şerif KAYMAZ
Ankara Üniversitesi Veteriner Fak.
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Aysel BAYHAN ÖKTEM
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fak.


Prof. Dr. Ömer ESENDAL
Ankara Üniversitesi Veteriner Fak.


Doç. Dr. Haydar ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi Veteriner Fak.


Doç. Dr. U. Tansel ŞİRELİ
Ankara Üniversitesi Veteriner Fak.

ÖNSÖZ

Geleneksel bir ürün olan çiğ köfte, yapımı ve bileşimi yönünden bazı farklılıklar gösterse de; genel olarak 1:1 oranında yağsız sığır kıyması ve bulgur ile lezzet vermek amacıyla tuz, soğan, biber ve domates salçası ile baharat karışımının elle yoğrulmasıyla hazırlanan ve çiğ olarak tüketilen bir gıda maddesidir. Genelde yapımından hemen sonra tüketilse de özellikle ticari olarak üretildiği restoran, market ve açıkta satıldığı tüketim yerlerinde uygun ve hijyenik olmayan şartlarda hazırlandığı ve satış süresince bekletildiği bilinmektedir.

Doğada yaygın olarak bulunan *Bacillus cereus* toprak kökenli bir mikroorganizma olup, başta değişik baharat olmak üzere hububatta, bitkisel ürünlerde, kuru gıdalarda, zeminle temas eden ette, et ürünlerinde, süt ve süt ürünlerinde bulunmaktadır; Gram pozitif, aerob, sporlu ve toksin üretme yeteneğindeki *B. cereus* özellikle çiğ köftenin hazırlanmasında başlıca katkı maddelerinden biri olan baharatta sıklıkla rastlanılmasına bağlı önemli risk faktörü mikroorganizmalardan biridir.

Çiğ köfte gerek yapımı aşamasındaki hijyenik şartların yetersizliği gerekse de ham maddelerinin hijyenik kalitesine bağlı olarak farklı patojen veya bozulmaya neden olabilen mikroorganizmalar ile kontamine olabilir. Bu çerçevede Türkiye’ de çiğ köftelere yönelik yapılan çalışmaların yetersizliği görülmüş ve çalışma kapsamında incelenen çiğ köftelerde *B. cereus*’ un gelişimi ve diyarel enterotoksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Tez çalışmamın yürütülmesinde ve doktora eğitimim süresince, ilgi ve desteklerini esirgemeyen başta danışmanım Doç.Dr. U. Tansel ŞİRELİ ve Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Şerif KAYMAZ olmak üzere tüm öğretim üyelerine, çalışmamdaki yardımlarından dolayı Vet.Hek.Dr. Özgür ÇADIRCI ve Araş.Gör. Muammer GÖNCÜOĞLU’ na, araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, laborant Sema BAL ve Anabilim Dalı Personeline, tüm sabır ve sevgileriyle yanımda olan dostlarıma, maddi ve manevi destekleriyle bugünümü borçlu olduğum aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>B. cereus</i> ' un Genel Özellikleri	2
1.2. <i>B. cereus</i> ' un Enterotoksin Üretimi ve Özelliği	6
1.3. <i>B. cereus</i> ' un Patogenes ve Virulens Özellikleri	8
1.4. <i>B. cereus</i> ' un Gıdalarda Bulunuşu	10
1.5 <i>B. cereus</i> ' dan Kaynaklanan Gıda Zehirlenmeleri	17
1.6. Gıdalarda <i>B. cereus</i> ' dan Kaynaklanan Bozulmalar	19
2. GEREÇ ve YÖNTEM	20
2.1. Gereç	20
2.2. Yöntem	30
2.2.1. <i>B. cereus</i> ' un İzolasyon ve İdentifikasyonu	34
2.2.1.1. Anaerob Glikoz Fermentasyon Testi	34
2.2.1.2. Nitrat Testi	34
2.2.1.3. Voges Proskauer Testi	35
2.2.1.4. Gram Boyama	35
2.2.1.5. Hareket Testi	35
2.2.1.6. Oksidaz Testi	35
2.2.1.7. Katalaz Testi	36
2.2.1.8. Jelatin Testi	36
2.2.1.9. Fermentasyon Testleri	36
2.2.1.10. Sitrat Testi	36
2.2.1.11. Hemoliz Oluşturma Yeteneği	37

2.2.1.12. İndol Testi	37
2.2.1.13. pH 5.7-6.8' de Üreme Yeteneğinin Belirlenmesi	37
2.2.2. Diğer Mikrobiyolojik Analizler	37
2.2.3. Diyarel Enterotoksin Oluşumunun Saptanması	38
2.2.4. Çiğ Köfte Örneklerinin pH Değerlerinin Ölçülmesi	39
2.2.5. İstatistiksel Analizler	39
3. BULGULAR	40
4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ	63
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

<	Küçüktür
>	Büyüktür
a_w	Su Aktivitesi
°C	Celcius (santigrad derece)
c AMP	Siklik Adenozin Monofosfat
g	Gram
kDa	Kilodalton
kGy	Kilogay
kob	Koloni oluşturan birim
\log_{10}	On tabanına göre logaritmik değer
ng	Nanogram
μm	Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Gıdalardan <i>B. cereus</i> ' un izolasyonu	31
Şekil 3.1. Ankara' da satışa sunulan çiğ köfte örneklerinde <i>B. cereus</i> ' un oran ve dağılımı (kob/g)(n:50).	41
Şekil 3.2. Çiğ köfte örneklerinin mikroorganizma dağılımı (n:50)	42
Şekil 3.3. Birinci deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	43
Şekil 3.4. Birinci deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	44
Şekil 3.5. İkinci deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	45
Şekil 3.6. İkinci deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	46
Şekil 3.7. Üçüncü deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	47
Şekil 3.8. Üçüncü deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> ' un seyri (log ₁₀ kob/g)	48

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Bazı gıdalarda diyarel sendroma neden olan <i>B. cereus</i> dağılımı	11
Çizelge 1.2. Amerika'da 1977-1984 yılları arasında <i>B. cereus</i> zehirlenme olguları	18
Çizelge 3.1. Ankara' da satışa sunulan çiğ köfte örneklerinde <i>B. cereus</i> ' un dağılımı	41
Çizelge3.2. Ankara' da satışa sunulan çiğ köfte örneklerinde mikroorganizma dağılımı	41
Çizelge3.3. Birinci deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	43
Çizelge3.4. Birinci deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	44
Çizelge3.5. İkinci deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	45
Çizelge3.6. İkinci deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	46
Çizelge3.7. Üçüncü deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	47
Çizelge3.8. Üçüncü deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda <i>B. cereus</i> 'un seyri (log ₁₀ kob/g)	48
Çizelge 3.9. 4 °C'de muhafaza edilen kontrol grubu çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (log ₁₀ kob/g).	49
Çizelge 3.10. 4 °C'de muhafaza edilen A grubu (10 ² kob/g <i>B. cereus</i> içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (log ₁₀ kob/g).	49
Çizelge 3.11. 4 °C'de muhafaza edilen B grubu (10 ⁴ kob/g <i>B. cereus</i> içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (log ₁₀ kob/g).	50
Çizelge 3.12. 4 °C'de muhafaza edilen C grubu (10 ⁶ kob/g <i>B. cereus</i> içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı(log ₁₀ kob/g).	50

Çizelge 3.13. 25 °C'de muhafaza edilen kontrol grubu çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).	51
Çizelge 3.14. 25 °C'de muhafaza edilen A grubu (10^2 kob/g <i>B. cereus</i> içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).	51
Çizelge 3.15. 25 °C'de muhafaza edilen B grubu (10^4 kob/g <i>B. cereus</i> içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).	52
Çizelge 3.16. 25 °C'de muhafaza edilen C grubu (10^6 kob/g <i>B. cereus</i> içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).	52
Çizelge 3.17. 25 °C' de BCET-RPLA test kitiyle yapılan enterotoksinin belirlenmesi.	55



1.GİRİŞ

Geleneksel bir ürün olan çiğ köfte, Türkiye'nin bir çok yöresinde sevilerek tüketilmektedir. Yapımı ve bileşimi bölgesel bazı farklılıklar göstermekle birlikte, genellikle 1: 1 oranında yağsız sığır kıyması ve bulgur ile yöresel damak tadına bağlı olarak değişik baharatın, tuz, soğan, maydanoz, biber ve domates salçası katılarak elle yoğrulmasıyla hazırlanan ve kısa sürede tüketilen bir et ürünüdür. Çiğ köfte gerek ham madde ve katkı maddelerinin hijyenik kalitesi gerekse de üretimi esnasındaki personel ve mutfak hijyenine bağlı olarak değişik patojen veya bozulma yapan mikroorganizmalar ile kontamine olabilir. Özellikle *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* ve *Bacillus cereus* gibi mikroorganizmalar veya bunların toksik metabolitleri ile kontamine olabilir. Bununla birlikte, değişik şekillerde kontamine olmuş çiğ köftelerin çiğ olarak tüketilmesine bağlı olarak halk sağlığı yönünden ciddi problemler oluşturacak bir gıda maddesine dönüşebileceği bilinmektedir (Bennett, 1995; Erol, 1999).

Bacillus cereus, gıda zehirlenmelerine neden olan ve doğada yaygın olarak bulunan aerob, sporlu, patojen bir mikroorganizmadır. Bir yandan proteolitik etkisiyle gıda maddelerinde kokuşmaya varan bozulmalara neden olurken, diğer yandan da ısıya dirençli sporları ve toksin oluşturma yeteneğiyle gıda hijyeni açısından önemli bir patojendir (Swanson ve ark., 1992). Pek çok gıda maddesinin doğal mikroflorasında bulunduğu gibi çiğ köftenin hazırlanmasında bulunan katkı maddelerinde de bulunması bu mikroorganizmanın çiğ köfteler yönünden de önemini arttırmaktadır. Çeşitli tahıllar, et-süt ve bunlardan elde edilen ürünler, hazır yemekler, tatlılar, salatalar *B. cereus*' un sıklıkla izole edildiği gıda maddeleridir (Baumgart, 1993; Becher ve ark., 1994).

B. cereus tarafından oluşturulan toksinler gıdalarda uygun sıcaklık ve sürede vejetatif hücrelerin üremesine bağlı olarak, gıdalarda bulunabilirler. Özellikle hazırlanmış gıdaların uygun olmayan koşullarda uzun süre bekletilmesi ve servis

öncesi ısıtma işleminin hatalı yapılması *B. cereus'* a bağlı gıda zehirlenmelerinin önemini arttırmaktadır (Erol, 1999).

Baharatla muamele edilmiş et ve et ürünleri önemli bir yere sahiptir. Her ne kadar teknik ve hijyenik şartlara sahip kesimhanelerden elde edilen çiğ etlerde *B. cereus'* a düşük oranlarda rastlanırsa da, baharatta hijyenik kalitenin yetersizliği nedeniyle etken yüksek oranlarda tespit edilmektedir (Rosenberger ve Weber, 1993; Erol ve ark., 1999; Garcia ve ark., 2001). Bu iki ürünün karışımı olan çiğ köfteler bu bağlamda *B. cereus* yönünden risk oluşturabilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda *B. cereus'* a sıklıkla baharatta rastlanması dikkate alınarak planlanan çalışmadaki çiğ köfte örneklerinin temel katkı maddelerini baharatın oluşturması, çiğ köfte üretim standardı olmaması, bu ürünün ısı işlemi uygulanmadan tüketilmesi, satış reyonlarında yasal bir bekleme sürelerinin olmaması ve Türkiye' nin bir çok yöresinde sevilerek tüketilen geleneksel bir ürün olması konunun önemini arttırmaktadır.

Bu çalışmada geleneksel bir ürün olan ve uygun olmayan muhafaza koşullarında ve hijyenik şartlara sahip olmayan yerlerde hazırlanan, çiğ köftelerde *B. cereus* varlığı ve enterotoksin üretme yeteneğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. *Bacillus cereus'* un Genel Özellikleri

Bacillus cinsi ilk defa 1872 yılında Cohn tarafından tanımlanmış olup, bu cins içerisinde yer alan *B. cereus* ise ilk olarak Frankland ve Frankland tarafından 1887 yılında identifiye edilmiştir (Buchanan ve Gibbans, 1984).

Bacillaceae familyasına bağlı *Bacillus* genusunda başlıca 34 tür bulunmaktadır (Sneath, 1988). Bu türler içerisinde *B. cereus* gıda kaynaklı intoksikasyonlardan en çok izole edilen türdür. Yapılan araştırmalarda bu tür dışında birçok *Bacillus* türünün de gıda zehirlenme ve bozulmalarına neden olduğu

bildirilmektedir. *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. licheniformis* ekmekte ipliğimsi bozulmalar yaparken, konserve gıdalarda *B. subtilis* ve *B. stearothermophilus* gaz oluşturmadan ekşimeye, *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. coagulans* ve *B. megaterium* gaz oluşturarak bozulmaya; *B. stearothermophilus*, *B. coagulans* ve *B. macerans*' in et ve et ürünlerinde bozulmalara neden oldukları da bildirilmektedir. *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* gıda zehirlenmeleri ile ilişkilendirilmiştir. *Bacillus* türleri gıda zehirlenme ve bozulmaları yanı sıra insan ve hayvanlarda farklı enfeksiyonlara da neden olmaktadır. Örneğin *B. anthracis*' in Şarbon etkeni, *B. thuringiensis*' in göz enfeksiyonları ve sığır mastitis etkeni ve *B. licheniformis*' in septisemi etkeni olduğu bildirilmektedir (Becker ve ark., 1984; Shinagawa, 1990; Jay, 1992; Jackson ve ark., 1995).

B. cereus, aerob veya fakültatif anaerob özellikte, çomak formunda, 3-5 µm uzunluğunda ve 1,0-1,2 µm genişliğinde bir mikroorganizmadır. Genellikle hareketli olmasına rağmen bazen hareketsiz suşlarına da rastlanılır. Gram pozitif olmakla beraber eski kültürlerde Gram negatif özellik göstermektedir (Sneath, 1988; Jay, 1992; Baumgart, 1993).

B. cereus'ların optimum üreme ısısı 28-35°C olup, 5-50 °C' ler arasında ürerler. Laboratuvar ortamında elde edilen minimum ve maksimum pH değeri 4.9-9.3 arasında ve minimum a_w (su aktivitesi) değeri ise 0.95' dir. Sodyum klorür'ün % 7'lik çözeltisinde üreme gösterirken % 10'luk sodyum klorür çözeltisinde üreyemez (Raevuori ve Genigeorgis, 1975; Johnson ve ark., 1983; Sneath, 1988; Van Netten ve ark., 1990; Baumgart, 1993; Erol, 1999).

B. cereus spor oluşturma özelliğinde olup, bu özellik, gıda güvenliği ve tüketici sağlığı açısından önem taşımaktadır. Endosporları sentral veya subterminal olarak yerleşmiş durumda bulunur. Bir günlük kolonilerden yapılan spor boyamada, 4-5 µm uzunluğunda ve 1-5 µm genişliğinde, sitoplazma kırmızı, sporlar açık veya koyu yeşil ve lipid granülleri ise siyah renkte görülür (Baumgart, 1993).

B. cereus sporları optimal 30°C' de vejetatif hale geçtiği, sıcaklığın düşmesine paralel olarak geçiş hızının yavaşladığı ve 4 °C' nin altında tamamen durduğu bildirilmiştir (Mol, 1957; Jay, 1992). Bazı araştırmacılar 4 °C' de üremenin meydana geldiğini minimum üreme sıcaklığını 1°C olarak bildirmişlerdir. Laboratuvar şartlarında -1 ile 59 °C' ler arasında spor oluşumu gözlenmiştir (Lund, 1991; Jaquotte ve Beuchat, 1998).

B. cereus sporları çevresel koşullara dirençlidir. Ayrıca kurutma, vakum, dondurma, ısı işlemleri ve çeşitli kimyasal maddelere ve dezenfeksiyonlara karşı oldukça dayanıklıdır (Buchanan ve Gibbons, 1984; Collins ve Lyne, 1985; Shigehisa, ve Lopez, 1988). Pendukar ve Kulkarni (1989), *B. cereus* sporlarının pirincin pişirilmesi ve ardından kızartılması işlemlerinde inaktive edilemediğini belirtmişlerdir. Wyatt ve Guy (1980), kabak tatlısı üzerinde yaptıkları bir araştırmada sporların fırınlama işlemi sonucunda canlı kaldığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada sporların yıkılma süresi 100 °C' de 40 dakika, 108 °C' de 10,5 dakika, 124 °C' de ise 7 dakika olarak saptanmıştır (Harmon ve ark., 1987). Yine Sharma ve ark. (1989) *B. cereus* ile kontamine çeşitli baharatın radyoaktif ışınlarla sterilizasyonu sonucu *B. cereus*' a rastlanmadığını bildirmişlerdir. Kamat ve ark. (1989), gıdalardan izole ettikleri *B. cereus* suşlarıyla yaptıkları çalışmada vejetatif hücrelerin % 90' ını inaktive edebilmek için gerekli gamma radyasyon dozunun 0.3-0.9 kGy (0.33-0.5 dakika) ve sporları için gerekli dozun 2.5-4 kGy (8-15 dakika) olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

B. cereus' un farklı iki tip toksini bulunmakta olup, toksinler iki ayrı gıda zehirlenmesine yol açabilmektedir.

1-Diyarel tip gıda zehirlenmesi

2-Emetik tip gıda zehirlenmesi

Diyarel tip toksin yaklaşık 50 000 molekül ağırlığa sahip, protein yapısında, ısıya dayanıksız, 56 °C' de 30 dakikada parçalanmaktadır (Turnbul ve ark., 1979). Bu

toksinin üretimi için optimal sıcaklık 32-37 °C' ler arasındadır. Diyarel tipte toksin hem gıda maddesi hem de bağırsaklarda üretilebilir. Gıdadaki toksin logaritmik üreme fazında gıdaya salınır (Lund, 1991). Deneysel olarak 8 °C' de de *B. cereus*' un diyarel toksin üretimi gösterilmiştir (Beuchat ve ark., 1997).

B. cereus' un diyarel toksini ile kontamine gıda maddesi alınmasından yaklaşık 6-15 saat sonra karın ağrısı, ishal ve bulantı ile karakterize semptomlar görülür. Genelde olgularda kusma görülmez, bu formdaki toksin zehirlenmesi semptomları *Cl. perfringens* tarafından oluşturulan gıda zehirlenmesine benzer. Diyarel tipteki zehirlenmeler, emetik tipten daha yumuşak seyrederek ve daha az görülür (Gilbert, 1988; Lund, 1991).

Diyarel tipteki zehirlenmelerden sorumlu gıdalar çok çeşitli olup, çiğ veya pişmiş et ve sebzeler, çorbalar, pudingler, süt ve süt ürünleri, soslar, konserve gıdalar ve çeşitli tip tatlılar gibi proteince zengin gıdalardır (Goepfert ve ark., 1972; Jay, 1992).

Diyarel tip zehirlenmelerde *B. cereus*' un dışkıdan izolasyonunun düşük seviyelerde mümkün olabileceği bildirilmiştir (Bilgehan, 1992; Steinhard ve ark., 1996). Tan ve ark. (1997), gıda zehirlenmesi olgularından alınan 15 dışkı örneğinin ELISA yöntemiyle yapılan incelemelerinde 10 örneğin *B. cereus* diyarel enterotoksini yönünden pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir.

Emetik tip toksin 5 000' den küçük moleküler ağırlığa sahip, antijenik olmayan peptid yapısında, ısıya dayanıklı olup, 121°C'de 1,5 saat dayanıklılığını koruyabilmektedir. Ancak 126 °C' de aynı sürede yıkımlanabilmektedir. Emetik toksin pH 2-11 ve tripsin ve pepsin gibi proteolitik enzimlere dayanıklıdır. Toksinin üretimi için optimal sıcaklık 25-30 °C' ler arasında olup, 10³-10¹⁰ kob/g seviyelerinde toksin oluşturabilmektedir (Raevuori ve Genigeorgis 1975; Cook ve ark 1991, Szabo ve ark, 1991; Notermans ve Batt, 1998).

Emetik tip zehirlenmelerde, risk grubu gıdalar özellikle tahıl ve pirinçli gıdalardır (Collins ve Lyne, 1985; Gilbert, 1988).

Emetik tip toksin zehirlenmelerinde inkubasyon periyodu 1-6 saattir. Bu olgularda semptomlar bulantı, kusma, kramplar ve ishale karakterizedir. Bu nedenle oluşturduğu semptomlara göre *Staphylococcus aureus*' dan meydana gelen zehirlenmelerle karışabilir (Doyle, 1988; Gilbert, 1988; Jay, 1992; Steinhard ve ark., 1996). Olgularda toksin kimi durumlarda dışkıda ve daha çok da kusmaya bağlı mide içeriğinden izole edilebilir (Bilgehan, 1992; Steinhard ve ark., 1996).

B. cereus' dan kaynaklanan gıda zehirlenmelerinde; semptomlar genellikle 12-24 saatte sona erer. Mortalite çok düşüktür. Japonya' da 1975' de diyarel tip zehirlenme olayında 3 ölüm, 1977' de pirinç kaynaklı emetik tip zehirlenme olayında ise bir ölüm bildirilmiştir (Shinagawa ve ark., 1985).

1.2. *B. cereus*' un Enterotoksin Üretimi ve Özelliği

Gıda zehirlenmesine, emetik enterotoksin, diyarel enterotoksin ve bunların enterotoksin ürünleri (extracelluler) olarak adlandırılan; lesitinaz, proteaz, β -laktamaz, cerolizin (fare öldürücü toksin, Hemolizin I) neden olur. Gıda zehirlenmesi gastroenteritis sendromunda 55 kDa molekül ağırlığındaki, siklikdodopepsinpeptit yapıdaki cerolizin rol oynar; daha sonra emetik ve diyarel enterotoksinler tarafından oluşturulur (Griffiths, 1990).

B. cereus tarafından oluşturulan toksik metabolitler vejetatif hücrelerin üremesi sırasında oluşurlar. Bu toksik metabolitler uygun sıcaklık ve sürede gıdalarda $>10^3$ kob/g düzeylerdeki *B. cereus* varlığı, bu toksik metabolitlerin oluşabilmesi için potansiyel bir tehlike olarak değerlendirilebilir. Enterotoksin önceden çiğ gıdada oluşabileceği gibi diyarel formda toksin hem gıda maddelerinde hem de bağırsaklarda üretilir. Aksi durumda toksin üretilmiş ve tahrip edilmeden

alınmışsa zehirlenme belirtileri daha kısa sürede ortaya çıkar. Toksinin canlı vücudunda üretilmesi uzun bir zaman alacağından dolayı semptomların görüleceği inkubasyon süresi de uzayacaktır (Töreci, 1983)

Psikrotrofik *B. cereus* 'un üremesi ve enterotoksin üretiminin 4°C'nin altındaki ısıda ve \leq pH 5 değerlerde inhibe edildiği bildirilmiştir (Van Netten ve ark., 1990). Bu toksin ısı, tripsin ve pronaza duyarlıdır, pH 6 ve 8.5' de üretilebilirken, pH 5 ve a_w 0.94' te toksin üretilmemektedir. Bazı suşlarında pH 7' de, 4°C' de 24 günde, 7 °C' de 12 günde, 17 °C' de 48 saatte toksin ürettiği saptanabilmiştir (Jay, 1992; Dufrenne ve ark, 1995; Steinhart ve ark., 1996).

Diyarel toksin logaritmik üreme fazında üretilir, fakat toksin durgun fazda maksimuma ulaşır. Toksin 10^6 ve 10^7 kob/g seviyelerinde tespit edilebilir (Collins ve Lyne, 1985; Jay, 1992). Bazı araştırmacılar enterotoksin oluşumu için *B. cereus* düzeyinin $>10^5$ kob/g olarak saptadıklarını bildirmektedirler (Tan ve ark., 1997). *B. cereus* enterotoksini *C. perfringens* enterotoksine benzer, vejetatif büyüme metabolitidir. Fosfolipaz ve cerolizine ayrılabilir. Bu purifiye toksin fare ölümlerine neden olur, bunun aktivasyon tarzı çok iyi bilinmemesine rağmen cAMP sistemini stimule ederek diyareye sebep olduğu düşünülmektedir (Jay, 1992).

Diyarel toksin besi yerlerinde laboratuvar ortamında ve diğer kültürlerde *B. cereus*' un üremesiyle, hızlı spesifik floresan immunoassay ve doku kültürlerinde, çeşitli deney hayvanlarında deri reaksiyonları ve intravenöz injeksiyon sonunda ölüm olayları ile tayin edilebilirken; emetik toksin sadece içerisinde pirinç olan besiyerlerinde izole edilebilir, diğer kültürlerde üretilemez (Johnson ve ark., 1982).

B. cereus 'un emetik toksin dışında üç farklı enterotoksik metabolit ürettiği ve bu toksinleri üreten bakterinin serotipleri arasında farklılıkların bulunduğu bilinmektedir. Fakat bu *B. cereus*' un serotiplendirilmesinde ayırıcı bir özellik değildir (Steinhart ve ark., 1996).

Emetik toksin; 4 amino ve/veya oxyasidin (D-O-Leu-D-Ala -L-O-Val-L-Val) üç tekrarından oluşan halka şeklinde bir yapıda ve 1,2 kDa moleküler ağırlığında olup, kimyasal olarak potasyum iyonofor valinomisin ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Granum ve Lund, 1997).

Emetik toksin molekül ağırlığı yönünden diyarel toksinden farklıdır, MA 5000 Dalton olup, ısı ve pH' ya dayanıklıdır, tripsin ve pepsine duyarlı değildir. Emetik toksin oluşturan suşlar optimal 35-40 °C' lerde, 15-50 °C' lerde de gelişebilirler. Emetik sendrom sıklıkla pirinç kaynaklıdır, bununla birlikte pastörize krema, spagetti, patates lapası, bitki filizleri olup, İngiltere, Kanada, Hollanda, Finlandiya, Japonya ve ABD' de bu toksinden kaynaklanan bir çok gıda infeksiyon ve intoksikasyon olguları bildirilmiştir (Jay, 1992; Baumgart, 1993).

B. cereus' un 3 farklı diyarel enterotoksini bulunmaktadır. Bu diyarel toksinlerdeki farklılık özelliği protein komponentlerinden kaynaklanmaktadır. Bunlardan ikisinin gıda zehirlenmelerine neden olduğu fakat tek protein komponentinden oluşan üçüncü enterotoksinin bugüne kadar analiz edilen gıda zehirlenmelerinde varlığı saptanamadığı bildirilmiştir (Granum ve Lund., 1997).

B. cereus suşlarından izole edilen üç farklı diyarel enterotoksinden biri hemolizin BL (HBL) toksinidir. Bu toksin hemolitik, sitotoksik, dermonekrotik ve enterotoksijenik aktivitelere sahip B, L₁ ve L₂ protein komponentlerinden oluşmaktadır (Beecher ve Wong, 1994; Beecher ve ark., 1995; Pruss ve ark., 1999). Diğer ikisi non-hemolitik özelliktedir (Hansen ve Hendriksen, 2001). Non-hemolitik enterotoksin 41.0, 39.8 ve 36.5 kDa molekül ağırlığındaki A, B ve C komponentlerinden oluşmaktadır, non-hemolitik enterotoksin T ve hemolitik enterotoksin proteinleri arasında benzerlik olduğu bildirilmektedir (Lund ve Granum, 1996; Lund ve Granum 1997; Granum ve ark., 1999).

1.3. *B. cereus*' un Patogenez ve Virulens Özellikleri

Bir çok ülkede izole edilen *B. cereus* suşlarının çoğunun enterotoksin üretebilme yeteneğindeki suşlar olduğu; fakat bunların toksin oluşturabilecek seviyelere kadar gıdada üremediği bildirilmiştir (Becker ve ark., 1984). Granum (1994) etkenin düşük seviyelerde bulunması ve hedef organ ve dokulara ulaşmadan önce inaktive olmasından dolayı, bu suşların şiddetli bir hastalık oluşturmadığı sonucuna vardığını bildirmiştir.

B. cereus' un vejetatif formları ve sporlarının ağız yoluyla alınması ve etkenin ince bağırsaklarda kolonize olması ile gıda zehirlenmesine neden olur. Süt ürünleri ve bitkisel orijinli gıdalar bu mikroorganizma için en büyük risk kaynağıdır. Etken hemolizin, fosfolipaz-C, enterotoksin ve emetik toksine sahiptir (Sinev ve ark., 1993).

Hemolizin II' nin varlığı ile ilgili bilgilere göre hemolitik faktörün hemolizin II' den bağımsız olduğu, buna karşın başka bir görüşte ise hemolitik aktivitenin lesitinaz ve sfingomyelinazın birlikte etkileşiminden kaynaklandığıdır. Hemolizin II ve cerolizin benzeri hemolizin, her ikisi de "Arrhenius etkisi" sergiler ve bunların moleküler ağırlıkları benzerdir (Jay, 1992).

B. cereus' un gıda zehirlenmesine sebep olması dışında gözde destructiv (yıkıcı) etkiside vardır (Drobniewski, 1993). Becker ve ark. (1984) *B. cereus*' un okuler etkisinin olduğunu ve bunun hemolizin II' den kaynaklandığını bildirmişlerdir.

B. cereus' dan siklik dodokadepsipeptit yapıda, Hep-2 hücrelerinde (doku kültürü) vakuol meydana getirebilen ve potasyum iyonofor valinomisine benzerlik gösteren cereludin izole edilmiştir (Agatha ve ark. 1984). Bu araştırmacılar aynı zamanda enterotoksin geni olan 41 kDa molekül ağırlığındaki bce-T geni ile yaptıkları çalışmalarda; bu genin vero-hücrelerinde sitotoksik etki oluşturduğu, vakuoler permeabilityi etkilediği, fare ileal lobunda sıvı birikimine sebep olduğu ve

infeksiyondan sonrada farede ölüm görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu gen gıdalardan, topraktan ve 10 klinik olgudan izole edilmiştir (Agatha ve ark. 1994). Yine topraktan izole edilen bazı suşların diyarel gıda zehirlenmesine neden olabileceği bilinmektedir.

Etki tarzı ve mekanizması çok iyi bilinmemekle birlikte diyarel enterotoksinin, cAMP sistemini stimule ederek diyareye neden olduğu düşünülmektedir (Jay, 1992; Granum, 1994).

Diyarel enterotoksin üreten 3 *B. cereus* suşu ile yapılan çalışmada sucuktan izole edilen toksinin tavşanlarda iluemde hemoraji ve deride vasküler permeabiliteye neden olduğu saptanmıştır. Yine bu çalışmada histopatolojik incelemelerde bağırsaklarda villöz atrofi, lamina propria ve submukozada mononükleer hücre infiltrasyonu ve submukozada hemoraji ve konjesyon görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada sucuktan elde edilen enterotoksin tavşanlara intradermal olarak verildiğinde; enjeksiyon bölgesinde şiddetli nekrotik reaksiyona ve 4 saat içinde de ölümlere neden olduğu belirlenmiştir. Nekropsideki histopatolojik incelemelerde karaciğerde portal vena ve sinuzoidlerde konjesyon, hepatositlerde vakouler dejenerasyon ve safra kanallarında hiperplazi dikkati çekmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda; *B. cereus* enterotoksininin lokal olarak kapillar kan damarlarını etkilediği ve sistematik olarak da proteniöz eksudat salınmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Singh ve ark., 1992).

1.4. *B. cereus'* un Gıdalarda Bulunuşu

B. cereus doğada toprakta, tozda, suda doğal olarak bulunmaktadır. Bu yüzden de gıda maddelerinin bu mikroorganizma ile kontaminasyonu kolaydır (Sneath, 1988).

Goepfert ve ark. (1972), değişik tipteki gıda maddeleri içerisinde *B. cereus*' dan kaynaklanan olguları dikkate alarak sucuk, sosis, tavuk, çiğ ve pişirilmiş sebzeler, etli sebze yemekleri, soslu tatlılar, balık, pasta, süt ve dondurmalarda *B. cereus* ile kontaminasyon düzeyinin yaklaşık 5.0×10^5 - 9.5×10^8 kob/g gibi oldukça yüksek düzeylerde olduğunu belirlemişlerdir.

Wong ve ark.'nın (1988) süt ve süt ürünlerinde yaptıkları çalışmada fermente sütte % 17, dondurmada % 52, farklı tip yumuşak dondurmada % 35, aromalı ve aromasız pastörize sütte % 35 ve süt tozu örneklerinde % 29 oranlarında *B. cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Van Netten ve ark. (1990), 483 pastörize süt örneğinin 41' inde (% 8.4), 53 peynir örneğinin 1' inde (% 2) 1.0×10^2 - 6.0×10^4 kob/g düzeyinde *B. cereus* saptadıklarını bildirmişlerdir.

Çizelge 1.1. Bazı gıdalarda diyarel sendroma neden olan *B. cereus* dağılımı (Van Netten ve ark., 1990)

Gıdalar	Örnek sayısı	<i>B.cereus</i> pozitif (%)	<i>B. cereus</i> sayısı \log_{10} kob/g				
			<2,0	2,0-3,0	3,0-4,0	4,0-5,0	>5,0
Baharat	33	42	19	6	6	1	1
Yumurta sarısı ,toz	34	29	24	10	0	0	0
Yumurta sarısı, sıvı	29	24	22	7	0	0	0
Krema	48	19	39	0	4	3	2
Kremalı pasta	83	11	74	4	3	0	2
Pastörize süt	483	8	442	6	17	11	7
Rosto kızarmış	48	8	44	3	1	0	0
Pirinçli yemek	551	6	518	17	10	4	2
Tavuk rosto kızarmış	38	5	36	1	1	0	0
Balık, kremalı	25	4	24	1	0	0	0
Bezelye çorbası	69	3	67	1	1	0	0
Lazanya	35	3	34	0	0	1	0
Çiğ süt	53	2	52	1	0	0	0
Sebze salatası	54	2	53	1	0	0	0
Hazır gıda	72	1	71	1	0	0	0
Mantar	45	0	45	0	0	0	0

Blakey ve Priest (1980) 108 iğ pirinç örneğinde yaptıkları çalışmada örneğlerin 98' inde *B. cereus*' u saptarken; aynı araştırıcılar 1986 yılında 12 farklı tahıl ve bakliyatı içeren toplam 39 örneğın 22' sinde (% 56) *B. cereus*' u bulduklarını bildirmişlerdir. Chung ve Sun, (1986) Taiwan' da 12 çiğ pirinç örneğinin 11' inde 2.0×10^2 kob/g düzeylerinde *B. cereus* izole etmişlerdir.

B. cereus' un gıdalarda bulunuşunda önemli bir grup da baharat ve baharat ilave edilmiş et ve et ürünleri oluşturmaktadır. Pafumi, (1986) baharatın mikrobiyel kalitesi üzerinde yaptığı bir çalışmada kimyon örneğlerinin % 26.6' sında, karabiber örneğlerinin % 81.4' ünde 10^2 - 10^5 kob/g düzeyinde *B. cereus* bulunduğunu bildirmiştir. Yine Van Netten ve ark. (1990), yaptıkları bir çalışmada baharatın % 42' sinin *B. cereus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Nijerya' da, marketlerde satışa sunulan ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış 5 çeşit, toplam 230 adet baharat (yöresel biber, kırmızı biber, kara biber, kekik, köri) örneğinin mikrobiyolojik yönden yapılan analizinde, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. polymyxa* ve *B. coagulans*' a yüksek miktarlarda rastlandığı belirtilmiştir (Antai, 1988).

Uruguay' da toplam 60 örneğten oluşan 3 farklı baharat (kırmızı biber, tarçın ve fil kulağı) içeren bir çalışmada örneğlerin % 70.6' sında *Bacillus* spp. izole edilirken, bunların % 41' ini *B. cereus* pozitif olarak belirlemişlerdir. *B. cereus* pozitif örneğlerin % 33' ünde kontaminasyon düzeyinin 1.0×10^6 kob/g' dan yüksek olduğu bildirilmiştir (Deambrosis ve Da Silva, 1992).

Rosenberger ve Weber (1993), alışmalarında *B. cereus*' u kırmızı toz biber ve karabiber örneğlerinde 10^2 - 10^3 kob/g düzeyinde belirlemelerine rağmen, kimyon örneğlerinden izole edemediklerini; buna karşın Bhat ve ark. (1987), baharatta yaptıkları çalışmada 6 toz kırmızı biber örneğinin 4' ünde 1.2×10^2 - 1.0×10^3 kob/g

düzeylerinde, 6 kimyon örneğinin birinde 3.0×10^1 kob/g düzeyinde *B. cereus* pozitif olarak saptamışlardır.

Garcia ve ark. (2001), Meksika'da tüketime sunulan 304 paketlenmiş ve paketlenmemiş baharat numunesinin mikrobiyolojik kaliteleri üzerine yaptıkları çalışmalarında 32 örneğin *B. cereus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Japonya' da mezbahalardan, et işletmelerinden ve marketlerden alınan toplam 1963 et ve et ürünü ile işletmelerde kullanılan katkı maddeleri örneklerinin yapılan analizinde 820 et ürününün (jambon, sosis, hamburger vb) % 18.3' ünde, 534 çiğ et örneğinin (sığır, domuz ve tavuk eti) % 6.6' sında *B. cereus* izole ve identifiye edilirken, kontaminasyon düzeyleri 10^2 kob/g'm altında saptanmıştır. 300 baharat örneğinin bulunduğu toplam 609 gıda katkı maddesi örneği (baharat çeşitleri, şeker, tuz, nişasta, hayvansal ve bitkisel protein) üzerinde yapılan çalışmada baharatın 119' u (% 39.7) pozitif tespit edilmiş, *B. cereus* düzeylerinin 10^2 - 10^4 kob/g olduğu bildirilmiştir (Konuma ve ark., 1988).

Bachhil ve Jaiswal (1988), yaptıkları bir çalışmada bufalo etinde % 35, kebapta % 100 ve köri ile hazırlanmış yemeklerin % 35' inde *B. cereus* izole etmişlerdir. Bu çalışmada *B. cereus* izole edilen bufalo örneklerinin % 30' u ile kebab ve köri ile hazırlanmış yemeklerin ise % 60' ının enterotoksijenik *B. cereus* ile kontamine olduğunu saptamışlardır.

Ternström ve Molin (1987), çiğ sığır, domuz ve tavuk etinden oluşan toplam 135 örnek üzerinde yaptıkları çalışmalarında sığır etinde % 11, domuz etinde % 7 oranında *B. cereus* izole ederken, tavuk etlerinde etkeni saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Hefnavy ve ark. (1984) Mısır' da toplam 150 et ürünü örneğinden oluşan bir çalışmada *B. cereus*' un genel kontaminasyonunu % 22.6 (34/150) olarak bulurken,

bu çalışmada kıyma örneklerinin % 18 (18/100), sucuk örneklerinin % 28 (7/25), pastırma örneklerinin % 36 (9/25) oranında *B. cereus* içerdiğini bildirmişlerdir.

Roberts ve ark. (1989) uçaklarda verilen toplam 1013 farklı yemek örnekleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada ortalama 10^2 kob/g düzeylerinde, *B. cereus*' u izole etmişlerdir. *B. cereus* pozitif olan 14 örneğin 7' sinin deniz ürünü, 4' ün sığır eti, 2' sinin kuzu eti ve birinin de kanatlı eti olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada servis edilen toplam 240 adet çeşitli tatlı örneğinin 12' sinde (% 5.0) 4.0×10^2 - 5.2×10^5 kob/g düzeyde ve toplam 85 sandviç örneğinden 3' ünde (% 3.5) *B. cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Kamat ve ark. (1989), analiz ettikleri toplam 124 gıda örneğinde, pirinç ve pirinç içeren yemeklerin % 28' inin (haşlanmış pirinçte % 100), balıkların % 40' inin, tavuk ve et yemeklerinin % 80' ininin, baharatın % 30' unun ve dondurma çeşitlerinin % 87' sinin, 2.0×10^2 - 5.0×10^5 kob/g düzeyinde *B. cereus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Türkiye' de *B. cereus*' dan kaynaklanan infeksiyon ve intoksikasyonlar üzerine sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılsa da, farklı türlerde ve tiplerdeki gıda örneklerinde (yaklaşık 10^2 - 10^4 kob/g düzeylerinde) *B. cereus*' a rastlanıldığı bildirilmiştir. Türkiye' de 1992-96 yılları arasında konserve ve dondurulmuş gıdalar, hazır çorbalar, beyaz peynir, hazır yemekler, pasta ve sütlü tatlılar' da *B. cereus*' un varlığını saptamaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Aksu ve Ergün, 1994a; Aksu ve Ergün, 1994b; Bostan ve Aksu, 1995; Aksu ve Ergün, 1995; Aksu ve Ergün, 1996).

Bu çalışmalardan birinde 59 konserve ve 74 dondurulmuş gıda örneğinde ki çalışmada konserve gıda örneklerinin hiçbirinde *B. cereus* izole edilememişken, dondurulmuş gıda örneklerinden biri hamburger diğeri de talaş böreği olmak üzere iki örnekte *B. cereus* % 2.7' inde ortalama 10^2 kob/g düzeylerinde kontamine olduğunu saptamışlardır (Aksu ve Ergün 1994a).

İstanbul bölgesinde 39 farklı üretim ve satış noktasından alınan toplam 160 hazır yemek örneğinin 16' sında (% 10) ortalama 10^2 - 10^3 kob/g düzeyinde *B. cereus* izole edilmiştir. Pirinç ve hamur ağırlıklı 87 yemek örneğinden 5' inin (% 5.7); etli ürünlerden ise % 25' inin *B. cereus* ile kontamine olduğu ve bu ürünler içerisinde yer alan çiğ köfte, kadınbudu köfte ve içli köfte örneklerinde bu oranın % 29.1' e çıktığı belirtilmiştir. Bu nedenle köftelerin hazırlanması sırasındaki işlemlerin uzun sürmesi, yapım tekniği, personel hijyeni ve kontamine baharat ve katkı maddeleri olabileceğini bildirilmiştir (Aksu ve Ergün, 1995).

Aksu ve Ergün (1996); pastanelerde satışa sunulan çeşitli tip ürünlerden aldıkları toplam 71 örneğin % 7' inde (5/71) 10^2 - 10^3 kob/g düzeylerinde *B. cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yine aynı araştırmacıların 1994 yılında hazır çorbalarda yaptıkları çalışmada (1994b) toplam 86 örneğin 16' sında (% 18.6) *B. cereus* saptamışlardır. Bu 16 pozitif örneğin 15' inde (% 93.75) 10^2 - 10^3 kob/g , 1' inde (% 6.25) 10^3 - 10^4 kob/g düzeyinde *B. cereus* saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar *B. cereus'* un kurutma işlemine dayamklı olması, toprak ve çevrede yaygın olarak bulunması nedeniyle bu tür gıda maddelerinde bulunması ihtimalinin arttığı sonucuna varmışlardır.

Bostan ve Aksu (1995); beyaz peynirlerde *B. cereus'* un varlığı ve yaşam süresi üzerine yaptıkları çalışmalarında piyasadan temin edilen 40 beyaz peynir örneğinin 2' sinde (% 5) 1.0×10^2 - 2.0×10^2 seviyelerinde *B. cereus* izole etmişlerdir. Deneysel olarak yapılan bu çalışmada çiğ süttten ve starter kültür ilave edilerek pastörize süttten yapılan beyaz peynirlerde *B. cereus'* un yaşam süresinin olgunlaşmanın erken döneminde en yüksek seviyede iken, çiğ süt peynirlerinde olgunlaşmanın 28. günü, pastörize süttten yapılan peynirde ise 14. gününde etkene rastlanmadığını bildirmişlerdir.

Van piyasasında satışa sunulan bazı baharat çeşitlerinde *B. cereus'* un varlığı ve önemi üzerine yapılan bir çalışmada, Van piyasasında ambalajlı ve açık olarak

satışa sunulan bazı baharattan (karabiber, kimyon, tarçın, toz kırmızı biber ve pul kırmızı biber), 20' şer adet olmak üzere toplam 100 adet baharat örneği mikrobiyolojik analize alınmış, ambalajlı ve açık baharat örneklerinde ortalama *B. cereus* sayısı karabiberde 1.0×10^3 kob/g; kimyonda 3.9×10^2 kob/g; tarçında 2.9×10^2 kob/g; toz kırmızı biberde 6.0×10^2 kob/g ve pul kırmızı biberde 6.3×10^2 kob/g olarak bildirilmiştir. Analize alınan baharatın % 55'inin *B. cereus* ile kontamine olduğu ve kontaminasyon oranının karabiberde % 100, diğer baharat çeşitlerinde ise % 30-60 arasında değiştiği bildirilmiştir (Ağaoğlu ve ark., 1999a).

Ağaoğlu ve ark. (1999b) Van piyasasında tüketime sunulan bazı gıda maddelerinde *B. cereus*' un saptanmasına yönelik yaptıkları çalışmada toplam 270 örneğin % 8.5' inden etkeni izole ettiklerini bildirmişlerdir. *B. cereus*' un tatlı çeşitlerinde % 14, paket çorbalarda % 1.1 ve tahıl ve baklagillerde % 18.7 oranında kontamine olduğunu tespit etmişler ayrıca bulgurun % 50 oran ile *B. cereus* yönünden en kontamine gıda maddesi olduğunu belirtmişlerdir.

Benzer şekilde başka bir çalışmada, 40 adet çiğ süt, 75 adet otlı peynir ve 25 adet tereyağı olmak üzere toplam 140 örnek analiz edilmiş olup, çiğ süt örneklerinin % 10' unda ortalama 1.0×10^2 - 2.8×10^4 kob/g, otlı peynirlerin % 1.3' ünde ortalama 9.0×10^2 kob/g düzeyinde *B. cereus* izole edilirken, tereyağı örneklerinin hiçbirinde *B. cereus* 'a rastlanmadığı bildirilmiştir (Ağaoğlu ve ark 1999c).

Kaymaz (1987), Ankara' da tüketime sunulan çiğ ve pişmiş 22' şer hamburger örneğinde yaptığı çalışmada 6.0×10^5 kob/g, 2.0×10^4 kob/g düzeyinde *B. cereus* saptadığını bildirmiştir.

Erol ve ark. (1999), Ankara' da tüketime sunulan baharatın mikrobiyolojik kaliteleri üzerine yaptıkları çalışmalarında karabiber örneklerinin % 80' inde, kırmızı toz biber örneklerinin % 44' ünde, pul biber örneklerinin % 36' sında, kimyon örneklerinin % 28' inde ve hindistan cevizi örneklerinin % 40' unda ortalama 10^2 kob/g düzeyinde *B. cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Küplülü ve ark. (2000), Ankara' da tüketime sunulan çiğ köftelerin mikrobiyolojik kaliteleri üzerine yaptıkları çalışmada, 50 çiğ köfte numunesinin % 46' sında ortalama 10^2 - 10^4 kob/g düzeyinde *B. cereus* saptadıklarını bildirmişlerdir.

Ekemen (2002), sütlü tatlıların mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi amacıyla yaptığı çalışmada, Ankara garnizonundaki birliklerden alınan 150 tatlı örneğinden (sütlaç, keşkül, kazandibi, tavuk göğsü, supangile ve muhallebi) sütlaç örneklerinin % 20' sinde ortalama 8.1×10^3 kob/g, muhallebi örneklerinin % 12' sinde ortalama 5.7×10^3 kob/g *B. cereus* saptadığını bildirmiştir.

1.5. *B. cereus*' dan Kaynaklanan Gıda Zehirlenmeleri

B. cereus' un gıda zehirlenmeleri ile ilişkili olduğu Avrupa'da ilk kez Plaziwolski tarafından 1906 yılında rapor edilmiştir. Bu etken taksonominin geliştirildiği 1950'lerin başlarına kadar gıda zehirlenmesi etkeni olarak bilinmemekteydi. Avrupa'daki araştırmacıların 1950 yılındaki bulgularıyla Plaziwolski' nin bulguları benzemektedir. *B. cereus*' a bağlı gıda zehirlenmeleri ilk kez 1950-55 yılları arasında Norveç' te oluşan gıda zehirlenmesi olgularında bildirilmiştir; fakat 1970'lere kadar önemi tam olarak anlaşılamamıştır (Jay, 1992; Steinhard ve ark., 1996).

Gıda zehirlenmelerinde *B. cereus*' dan kaynaklandığı ileri sürülen Avrupa' da 1906 yılında 300 kişinin zehirlenmesi ile sonuçlanan hastane olgusu bilinen en eski olgudur. Yine Amerika Birleşik Devletleri' nde ilk kez 1969 yılında patates lapasından kaynaklanan olgu bildirilmiştir (Bennett, 1995).

Gianella ve Brasile (1979) karnı ağrısı, sulu diyare semptomları gözlenen fakat kusma ve ateş görülmeyen 28 hastanın 14' ünde sorumlu etken olarak *B. cereus*' u saptamışlardır. Ayrıca, Jackson ve ark. (1995), bir gastroenterit olayında enterotoksin oluşturan *B. cereus*' u izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Bryan (1988), 1977-1984 yılları arasında ABD' de görülen *B. cereus*' a bağlı gıda zehirlenmeleri ve sorumlu tutulan gıdaların sıklıkla pirinç ağırlıklı olan Çin yemeklerinden ve et ve baharat ağırlıklı olduğu bilinen, Meksika yemekleri gibi etnik menülerden kaynaklı 35 olgu bildirmiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Amerika'da 1977-1984 yılları arasında *B. cereus* zehirlenme olguları (Bryan, 1988)

Gıda	Olgu sayısı	Yüzdesi (%)
Kızarmış pirinç	17	48,6
Meksika yemekleri	5	14,2
Çin yemekleri	2	5,7
Hindi	2	5,7
Diğer gıdalar	9	25,7
TOPLAM	35	99,9

İspanya' da 4 kişinin tükettikleri Morina balığından 5 saat sonra diyare şikayetleri ile hastaneye gelen kişilerde *B. cereus* enterotoksin oluşturan psikrotrofik suşunun sorumlu olduğu ve 24 saat sonra toksikasyonun sonlandığı, iyileşmenin görüldüğü ve 7. günde dışkıda etkene rastlanılmadığı bildirilmiş olup, bu olguda izole edilen etkenin 4 °C' de 7 gün, 7 °C' de 4 günde toksin üreten HA 1 serotipi olduğu ve bu serotipin BCET-RPLA test kiti ile belirlendiği bildirilmiştir (Kramer ve Gibbert, 1989).

Benzer şekilde Hollanda' da ev yapımı sebzeli börek tüketimi sonucu 3 kişinin diyare ve karın ağrısı semptomlarıyla seyreden intoksikasyon olgusunda $2,0 \times 10^6$ kob/g düzeyinde *B. cereus* saptandığı ve aynı BCET-RPLA test kiti ile enterotoksin pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir (Kramer ve Gibbert 1989).

Türkiye' de İnal (1969); İzmir' de bir askeri birlikte fasulye piyazı ve etli türlü yenilmesinden kaynaklanan zehirlenmede yaklaşık 1000 kişinin etkilendiği bildirmiştir .

Doğanay ve Bakıcı (1985), 27 Mart 1985' de Sivas' ta aynı yerde çalışan 25 hastada görülen ve bulantı, karın ağrısı ve sulu diyare ile karakterize semptomlarla seyreden gıda intoksikasyonu olgusunda 4 hastanın dışkılarından sadece *B. cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

1.6.Gıdalarda *B.cereus*' dan Kaynaklanan Bozulmalar

B. cereus proteolitik özelliği ile proteinleri parçalayarak gıda maddelerinde kokuşma ve bozulmalara neden olur. Kontamine gıdada bozulma belirtileri zehirlenme oluşturabilecek düzeye ulaştıktan sonra ortaya çıkar; bu yüzden risk daha fazladır (Collins ve Lyne, 1985; Rodriguez ve Barrett, 1986; Christiansson ve ark., 1989; Griffiths, 1990;).

B. cereus yalnızca proteolitik bir mikroorganizma olmayıp, aynı zamanda yağ globulinlerini etkileyen lesitinaz' ı da oluşturur. Bu enzim kremalarda "bitty cream" denilen bozulmaya neden olduğu gibi pastörize sütlerde lesitinaz enzimi ile yağ globulin zarını parçalayarak asit oluşturmadan pıhtılaşmaya sebep olur (Baumgart, 1993; Özalp ve Kaymaz, 1995)

Yoğurтта, fermentasyon başlangıcında (pH 6.0) *B. cereus* hızla üreyerek kıvam hatalarına neden olur. Ayrıca tereyağında *B. cereus*' un aşırı üremesi sonucu fosfolipaz-C aktivitesine bağlı olarak metalimsi ve yakıcı bir lezzet oluşumu görülür (İnal, 1990).

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

Geleneksel çiğ köftelerde *B. cereus*' un varlığı ve enterotoksin üretme yeteneğinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Birinci aşamada, 2001-2002 Haziran dönemleri arasında Ankara' da tüketime sunulan (market, restoran ve açıkta satılan) en az 250' şer gramlık partiler halinde ve aseptik koşullar altında alınan toplam 50 çiğ köfte örneği kullanıldı. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, deneysel olarak aseptik koşullar altında hazırlanan ve 10^2 , 10^4 , 10^6 düzeylerinde *B. cereus*' un enterotoksin oluşturan suşu ile kontamine edilen ve 4 ve 25 ° C' lerde muhafaza edilen çiğ köfte örnekleri materyal olarak kullanıldı.

B. cereus' un İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) Agar (Oxoid, CM 929)

Bileşimi

Sığır eti ekstraktı	1,0 g
Pepton	10,0 g
D-Mannitol	10,0 g
Sodyum klorür (NaCl)	10,0 g
Fenol kırmızısı	0,025 g
Agar	12,0 g
Su	900 ml

Hazırlanışı

Formülasyonu hazır halde bulunan MYP Agar (Oxoid - CM 929) 21,5 g tartılarak 450 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH $7,2 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. Daha sonra su banyosunda agar çözünene kadar tutulmasını takiben, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de ve 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edilerek strelizasyonu sağlandı. MYP agar $45-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra, 2 ml steril distile su içerisinde çözündürülen 50.000 IU Polymyxin B (Oxoid - SR 99E) içeren supplement ve 50 ml yumurta sarısı emülsiyonu (Oxoid - SR 47) besiyeri içerisine steril koşullarda ilave edildi. Steril şartlarda yaklaşık 12-15 ml olacak şekilde petrilere döküldü.

Nutrient Agar (Merck 1.05440)

Bileşimi

Sığır eti ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Formülasyonu hazır halde bulunan Nutrient agar' dan 20 g alınarak 1000 ml distile su içerisinde çözündürüldü, pH' sı $7.0 \pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de ve 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edildi. Steril petrilere 12-15 ml olacak şekilde döküldü.

Nutrient Broth No:2 (Oxoid CM 67)

Bileşimi

Lab-Lemco powder	10,0 g
Pepton	10,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Formülasyonu hazır halde bulunan Nutrient Broth' tan 25 g tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözündürüldü, pH' sı 7.5 ± 0.2 olarak ayarlandıktan sonra 16 x 150 mm tüplere 5'er ml paylaştırıldı. 121 °C 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edildi.

Glikoz Agar

Bileşimi

Tripton	10,0 g
Maya ekstraktı	1,5 g
Glikoz	10,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Brom kreosol purple	0,015 g
Agar	12-18 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Hazırlanan karışım su banyosunda çözündürüldü, pH' sı $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlandıktan sonra 16 x 150 mm'lik tüplere 15'er ml kondu. 121 °C' de ve 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edildi. Kullanmadan önce besiyerleri kaynayan su banyosunda 10 dakika süreyle tutuldu, erimesi sağlamp tüpler dikey bir pozisyonda tutularak yaklaşık 30° C' ye kadar soğutuldu.

MR-VP Broth (Oxoid, CM 43)**Bileşimi**

Pepton	5,0 g
Glikoz	5,0 g
Fosfat buffer	5,0 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Formülasyonu hazır halde bulunan MR-VP broth'tan 15 g tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH' sı $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. 5 ml tüplere paylaştırıldı. $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edildi.

 α - Naftol çözeltisi**Bileşimi**

α - naftol	5,0 g
% 95 (v/v) Etanol	100 ml

Hazırlanışı

α - naftol' den 5 g tartıldı ve etanolde çözüldü.

Potasyum Hidroksit - Kreatin Çözeltisi**Bileşimi**

Kristal kreatin	0,3 g
Potasyum hidroksit (KOH)	40,0 g
Distile su	100 ml

Hazırlanışı

Potasyum hidroksit' ten 40 g alınarak distile suda çözündürülerek hazırlandı. Buna 0,3 g kreatin kristal formundan ilave edildi.

Nitrat Besiyeri**Bileşimi**

Pepton	5,0 g
Sığır eti ekstraktı	3,0 g
Potasyum nitrat	1,0 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Karışım su banyosunda eritildikten sonra pH' sı $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlandı, 16 x 150 mm'lik tüplere 5'er ml konuldu. 121 °C sıcaklıkta ve 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edildi.

Gries Ilosvay Solusyonu (A)**Bileşimi**

Sulfanilik asit	0,8 g
Asetik asit 5M	100 ml

Hazırlanışı

Sulfanilik asit 0.8 g tartıldı ve asetik asitte çözüldükten sonra filtreden süzüldü.

Gries Ilosvay Solusyonu (B)**Bileşimi**

α -Naftilamin	0,5 g
Asetik asit 5M	100 ml

Hazırlanışı

α -Naftilamin 0.5g tartılıp, asetik asit içinde çözüldükten sonra filtreden süzüldü.

Trypticase Soy Koyun Kanlı Agarı**Bileşimi**

Trypticase	15,0 g
Fiton pepton	5,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Agar	15,0 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Karışım su banyosunda eritildikten sonra pH' sı $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edildi. Besiyeri $45-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar soğutulduktan sonra %5 defibrine koyun kanı eklendi ve steril petrilere yaklaşık 12-15 ml olacak şekilde döküldü.

Gelatin Medium**Bileşimi**

Gelatin	4 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Karışım su banyosunda eritildikten sonra pH'sı 7.0 ± 0.2 'ye ayarlandı. Daha sonra 16 x 150 mm'lik tüplere 10'ar ml konuldu. $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklav edildi.

Katalaz Test

Hidrojen peroksit' in (H_2O_2) (Merck 8597) % 3'lük solüsyonu kullanıldı.

Oksidaz Testi

Hazır test kitleri (Oxoid BE 64 A) kullanıldı.

Oksidatif – Fermentatif (OF) Medium (Oxoid, CM 883)

Bileşimi

Sodyum klorür	5 g
Agar	2 g
Kazein	2 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Bromothymol blue	0.08 g
Karbonhidrat solüsyonu	100 ml
Distile su	900 ml

Hazırlanış

Karbonhidrat solüsyonu dışındaki karışım 900 ml distile suda çözündürülerek pH' sı 6.8 ± 0.1 'e ayarlandı. 121 °C'de 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutuldu. Üzerine 100 ml steril karbonhidrat solüsyonu ilave edilerek karıştırıldı ve tüplere paylaştırıldı.

Karbonhidrat çözeltisi: 1 g karbonhidrat 100 ml distile suda eritildi. Çözelti filtreden geçirilerek steril şişede saklandı. Her bir karbonhidrat için ayrı olarak hazırlandı.

Arabinoz (Merck 101492): 1 g 100 ml distile su içinde çözündürülerek 0.22 mikrolitrelik filtreden süzülüp steril edildi.

Maltoz (Merck 105911): 1 g 100 ml distile su içinde çözündürülerek 0.22 mikrolitrelik filtreden süzülüp steril edildi.

Glukoz (Merck 113732): 1 g 100 ml distile su içinde çözüdürülerek 0.22 mikrolitrelik filtreden süzülüp steril edildi.

Laktoz (Merck 107657): 1 g 100 ml distile su içinde çözüdürülerek 0.22 mikrolitrelik filtreden süzülüp steril edildi.

Sukroz (Merck 107651): 1 g 100 ml distile su içinde çözüdürülerek 0.22 mikrolitrelik filtreden süzülüp steril edildi.

Ksiloz (Merck 108692): 1 g 100 ml distile su içinde çözüdürülerek 0.22 mikrolitrelik filtreden süzülüp steril edildi.

Mannitol (Merck 105982): 1 g 100 ml distile su içinde çözüdürülerek 0.22 mikrolitrelik filtreden süzülüp steril edildi.

Simon's Citrate Agar (Difco 0091-17-1)

Bileşimi

Magnezyum sülfat	0,2 g
Amonyum dihidrojen fosfat	1 g
Dipotasyum fosfat	1 g
Sodyum sitrat	2 g
Sodyum klorür	5 g
Bacto agar	13 g
Bacto bromthymol blue	0,08 g

Hazırlanışı

Formülasyonu hazır besiyerinden 24.2 g alınıp, 1000 ml distile suda çözüdürüldü. pH ' sı 6.8 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda eritildi. Daha sonra 16 x 150 mm tüplere 10'ar ml paylaştırılarak, 121 °C' de 15 dakika otoklav edilerek yatık olarak soğutuldu.

SIM Medium (Oxoid, CM435)**Bileşimi**

Tripton	20,0 g
Pepton	6,1 g
Ferrous ammonium sulphate	0,2 g
Sodyum tiosulfat	0,2 g
Agar	3,5 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Formülasyonu hazır besiyerinden 30 g alınıp, 1000 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra, pH' sı $7,3 \pm 0,2$ olarak ayarlanarak 16 x 150 mm'lik tüplere 2' şer ml paylaştırıldı ve 121 °C' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edilerek sterilizasyonu sağlandı.

Tripton Broth**Bileşimi**

Tripton	10 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Karışım su banyosunda çözündürüldü, pH'sı 7.1 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra 16 x 150 mm'lik tüplere 5'er ml konuldu ve 121 °C'de 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edildi.

Indol Ayracı

Bileşimi

Paradimetil amino benzaldehit	5 g
İzoamilalkol	75 ml
Hidroklorik asit	25 ml

Brain Heart İnfüzyonu (Difco, 0037-17-8)

Bileşimi

Dana beyni	200 g
Sığır kalbi	250 g
Bacto proteose pepton	10 g
Bacto dekstroz	2 g
Sodyum klorid	5 g
Disodyum fosfat	2,5 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı

Formülasyondan 37 g alınarak, 1000 ml distile su içerisinde çözdürüldü, pH' sı $7,4 \pm 0,2$ olarak ayarlandı ve 16 x 150 mm' lik tüplere 7' şer ml konuldu. 121 °C' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edilerek, sterilizasyonu sağlandı.

BCET-RPLA Enterotoksin Test Kiti (Oxoid, TD 950)

BCET-RPLA hazır test kitleri kullanıldı.

Test Suşu

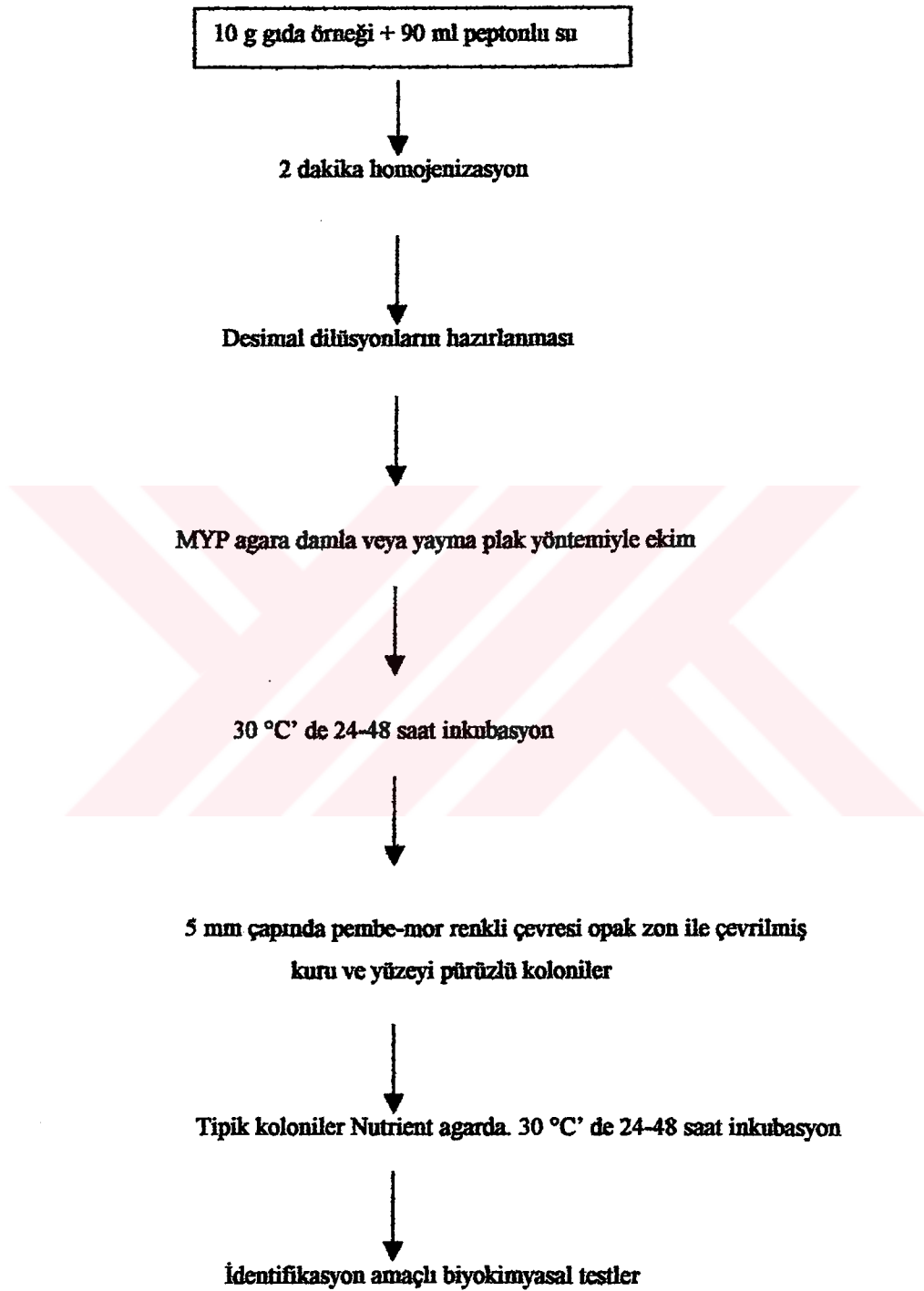
Çalışmada referans suş olarak enterotoksijenik *B. cereus* (OXOID-NCTC 11145) suşu kullanıldı.

2.2.Yöntem

Çiğ köfte örneklerinde, *B. cereus* varlığının saptanması ISO 7932 no' lu *B. cereus* sayımı için genel kurallar-koloni sayım tekniği (30 °C' de) standarda (Anon, 2000) göre yapılırken, identifikasyon amaçlı biyokimyasal testler Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology (Sneath, 1988) esas alınarak belirlendi (Şekil 2.1.). Enterotoksin oluşturma yeteneği BCET-RPLA test kiti ile yapıldı (Brett, 1998).

Bu çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Çalışmanın 1. aşamasında; Ankara' da market, restoran ve açıkta satılan, aseptik koşullarda özel termoslu kaplara 250' şer g alınan çiğ köfte örnekleri, soğuk zincir altında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarına getirilerek örneklerde *B. cereus* varlığı ve toksin oluşturma yeteneği ile genel mikrobiyolojik kalitesi belirlendi. Deneysel çalışma üç kez tekrar edildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında; deneysel olarak aseptik koşullar altında hazırlanan çiğ köftelerde enterotoksin oluşturma yeteneği bilinen *B. cereus* suşu ile 10^2 , 10^4 ve 10^6 düzeylerinde kontamine edilerek 4 ve 25 °C' lerdeki 0., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlik muhafaza süresince *B. cereus*' un gelişme seyri ve enterotoksin oluşturma yeteneği ile genel mikrobiyolojik kalitesi belirlendi.



Şekil 2.1. Gıdalardan *B. cereus*' un izolasyon yöntemi (Anon, 2000).

B. cereus'un identifikasyonu amacıyla ;

- Anaerob Glukoz Fermentasyonu
- Nitrat Testi
- Voges-Proskauer Testi
- Gram Boyama
- Hareket Testi
- Oksidaz Testi
- Katalaz Testi
- Jelatin Testi
- Fermentasyon Testleri
- Sitrat Testi
- Hemoliz Oluşturma Yeteneği
- İndol Testi
- pH 5,7-6,8' de Üreme Yeteneği

testleri uygulandı (Sneath, 1988).

Deneysel Çiğ Köftenin Yapılışı:

Sığır Eti	350 g
Bulgur	350 g
Soğan	150 g
Salça	100 g
Kırmızı pul biber	25 g
Tuz	10 g
Karabiber	5 g

1 kilogram çiğ köfte için uygulanan formülasyondur.

Laboratuar koşulları altında daha 6nceden analizleri yapılarak, *B. cereus* i6ermediği saptanan bulgur, ışımlanmış kırmızı pul biber ve karabiber, soğan, sal6a ve tuz ile steril distile su ilave edilerek yoğruldu. Daha sonra yağsız kıyma 6ię k6fte hamuru ile karıştırılarak macun kıvamına kadar yoğruldu. Geleneksel 6ię k6fte kıvamına gelen hamur partiler halinde ayrıldı.

Geleneksel y6ntem uygulanarak hazırlanan 6ię k6fte 6rnekleri aşağıda belirtildiği gibi gruplandırıldı.

- K Grubu: İ6eriğinde *B. cereus* i6ermeyen 6ię k6fte “kontrol grubu”.
- A Grubu: 6ię k6fte hazırlandıktan sonra enterotoksin oluşturma 6zelliği bilinen *B. cereus* NCTC-11145 suşu ile 10^2 kob/g d6zeyinde kontamine edilen grup.
- B Grubu: 6ię k6fte hazırlandıktan sonra enterotoksin oluşturma 6zelliği bilinen *B. cereus* NCTC-11145 suşu ile 10^4 kob/g d6zeyinde kontamine edilen grup.
- C Grubu: 6ię k6fte hazırlandıktan sonra enterotoksin oluşturma 6zelliği bilinen *B. cereus* NCTC-11145 suşu ile 10^6 kob/g d6zeyinde kontamine edilen grup.

Form6lasyona g6re hazırlanan ve macun kıvamına getirilen 6ię k6fte 6rneklerine, daha 6nce BHI broth’ ta birinci tekrar i6in $8,0 \times 10^7$ kob/ml d6zeylerine kadar, ikinci tekrar i6in $7,2 \times 10^8$ kob/ml d6zeylerine kadar ve 66nc6 tekrar i6in $6,8 \times 10^8$ kob/ml d6zeylerinde olan *B. cereus* suşu 10^2 , 10^4 ve 10^6 d6zeyleri olacak şekilde inokule edildi. 4-25 6C’ lerde 0., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde muhafaza edilerek analizleri yapıldı. Aynı işlem belirtilen şekilde deneysel 6alışma olarak 3 kez tekrar edildi.

Ayrıca, *B. cereus*'un toksin oluşturma yeteneğinin saptanması için, her bir gruptan aynı periyotlarda çiğ köfte örnekleri BCET -RPLA test kiti ile analiz edilmiştir.

2.2.1. *B. cereus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

Çiğ köfte örneklerinden steril şartlarda 10 g alınarak 90 ml peptonlu su (% 0.1 pepton) ile homojenize edildi. Daha sonra gerekli desimal dilüsyonları hazırlanarak (10^5 düzeyine kadar) yayma ve damla plak yöntemleri ile MYP agara ekimleri yapıldı. MYP agarda 30 °C de aerob koşullarda 18-40 saat inkübasyon sonucunda şekillenen 5 mm çapında pembe mor renkli etrafı opak zon ile çevrilmiş, kuru ve yüzeyi pürüzlü şüpheli koloniler sayıldı. Tipik kolonilerden 5 adet alınarak nutrient agarda geliştirildikten sonra identifikasyon amaçlı biyokimyasal testleri yapıldı. Test sonuçlarına göre Gram pozitif, katalaz, oksidaz, voges-proskuaver, hareketlilik, jelatin, nişasta, nitrat, sitrat, hemoliz, pH 6,8-5,7'de üreme, glukoz ve ksiloz'dan asit oluşumu, sukroz ve maltoz'dan gaz oluşumu pozitif, indol, mannitol ve arabinoz'dan asit oluşumu, laktoz ve glukoz'dan gaz oluşumu negatif olan koloniler *B. cereus* olarak değerlendirildi (Anon, 2000; Sneath, 1988).

2.2.1.1. Anaerob Glikoz Fermentasyonu

Şüpheli koloniler iğne uçlu öze ile yeni ısıtılmış glikoz agar içeren tüplere inokule edildi. 30 °C' de 24 saat anaerob olarak inkubasyona bırakıldı. Tüp içerisinde oluşan sarı renk pozitif olarak değerlendirildi (Anon, 2000).

2.2.1.2. Nitrat Testi

Şüpheli kolonilerden öze ile nitrat broth'lara geçildi. 37 °C'de 24 saat aerob koşullarda inkube edildi. Aynı besiyerine nitrat ayıracının (0,2 ml Griess A + 0,2 ml Griess B) damlatılmasından 15 dakika sonra kırmızı veya menekşe rengin oluşumu nitrat pozitif olarak değerlendirildi. Renk oluşmaması durumunda bir miktar çinko

tozu ilave edilerek kırmızı renk oluşumu ile nitratın indirgenmediği belirlendi (Anon, 2000).

2.2.1.3. Voges-Proskauer Testi

Seçilmiş koloniler VP besiyeri içeren tüplere inokule edildi. 30 °C'de 24 saat aerob koşullarda inkube edildi. Her tüpten 1 ml kültür, asetilmetilkarbinol deneyi için temiz bir tüpe aktarıldı. 0,2 ml potasyum hidroksit-kreatin çözeltisi, 0,6 ml α -naftol çözeltisi eklendi. Kuvvetlice çalkalandı ve 1 saat dinlenmeye bırakıldı. Eozin pembesi rengi oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Anon, 2000).

2.2.1.4. Gram boyama

Şüpheli kolonilerden Gram boyama yapıldı. Mikroskopun immersiyon objektifinde *B. cereus* Gram pozitif, çomak formda gözlemlendi.

2.2.1.5. Hareket Testi

Şüpheli koloniler iğne uçlu öze ile SIM agara inokule edildi. 30 °C' de 5-7 gün inkubasyona bırakıldı. İnokulasyon hattında gözlenen üreme pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.1.6. Oksidaz Testi

Hazır test kitleri (Oxoid BR 64A) kullanıldı. Şüpheli koloniler iğne uçlu öze ile alınıp oksidaz stiklere sürüldü, 10-20 saniyede oluşan menekşe mor renk pozitif olarak kabul edildi.

2.2.1.7. Katalaz Testi

Bu amaçla, % 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck 8597) çözeltilisinden bir öze dolusu lam üzerine alınarak, üzerine öze ile şüpheli koloniden konulup karıştırıldı, birkaç saniye içerisinde köpürme şeklindeki gaz oluşumunun gözlenmesi katalaz (+) olarak değerlendirildi.

2.2.1.8. Jelatin Testi

İçerisinde jelatin medium bulunan tüplere şüpheli koloniler inokule edilerek 25 °C'de 24-48 saat aerob koşulda inkube edildi. Tüpler 5 °C'de 1 saat bekletildiğinde jelatin sıvı hale geçmesi pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.1.9. Fermentasyon Testleri

OF medium da sükroz, glukoz, laktoz, manitol, ksiloz, arabinoz ve maltoz şekerlerinin % 1'lik çözeltileri hazırlandı. Her bir şeker için ayrı olarak içinde şeker çözeltilisi bulunan tüplere şüpheli koloniler inokule edilerek 25 °C'de 5-7 gün aerob koşulda inkube edildi. Renk değişimi ve gaz oluşumunun görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.1.10. Sitrat Testi

İçerisinde Simon Citrate Agar bulunan yatık agarlı tüplere şüpheli koloniler öze ile çizilerek 25 °C'de 24-48 saat aerob koşullarda inkübe edildi. Oluşan mavi renk pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.1.11. Hemoliz Oluşturma Yeteneği

Koyun kanı (% 5) ilave edilen TSSB Agar' a şüpheli koloniler öze ile çizildi. 30-35 °C'de 24 saat aerob koşullarda inkube edildi. Geniş ve büyük hemoliz alanlarının oluşumu pozitif olarak kabul edildi.

2.2.1.12. İndol Testi

şüpheli koloniden tripton broht içeren tüplere inokule edildi. 30-35 °C'de 24 saat aerob koşullarda inkube edildi. Kovaks ayıracından 1-2 ml ilave edildi. Pembe halka oluşumu gözlenmemesi negatif olarak değerlendirildi.

2.2.1.13. pH 5.7-6.8' de Üreme Yeteneğinin Belirlenmesi

şüpheli koloniden pH' sı 5.7 ve 6.8 olan nutrient brothlara bir öze dolusu inokule edildi. 30 °C' de 24-48 saat inkubasyon sonrasında üreme gözlenmesi pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.2. Diğer Mikrobiyolojik Analizler

Yaklaşık 200 g' lık partiler halindeki çiğ köfte örnekleri aseptik koşullarda steril plastik torbalara 10 g tartılarak üzerine 90 ml % 0.1'lik steril peptonlu su ilave edilip, 60 saniye homojenize (Lab. Blender 400) edildi. Elde edilen 10^{-1} 'lik dilüsyondan gerekli sayıdaki desimal dilüsyonları hazırlanarak yayma ve damla plak yöntemi ile ekimleri yapıldı (Baumgard, 1993; Swanson ve ark., 1992).

Aerob mezofil genel canlı tespiti için, Plate Count Agar'a ekimler yapıldı. Plaklar 30°C'de aerob ortamda 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan tüm koloniler değerlendirmeye alındı (Swanson ve ark., 1992).

Enterobakterilerin izolasyonu için, Violet Red Bile Glucose Agar'a ekimler yapıldı. Plaklar 37°C'de anaerob ortamda 24-48 saat inkube edildi ve inkübasyon sonucunda safrayı presipite eden mor kuşakla çevrili kırmızı-pembe koloniler değerlendirildi (Villagarcia, 1985; Hitchins ve ark., 1992). Koliformların izolasyonu için, Violet Red Bile Lactose Agar'a ekimler yapıldı. Plaklar 37°C'de anaerob ortamda 24-48 saat inkube edildi ve inkübasyon sonucunda presipitasyon oluşturan koyu kırmızı 1-2 mm çapında koloniler değerlendirildi (Hitchins ve ark., 1992). *Pseudomonas*' ların izolasyonu için, Pseudomonas Agar Base'e ekimler yapıldı. Plaklar 30°C'de aerob ortamda 24-48 saat inkube edildi ve inkübasyon sonucunda oksidaz pozitif olan koloniler değerlendirildi (Tryfinopoulou ve ark., 2001). Stafilokok ve mikrokokların izolasyonu için Baird-Parker Agar Base'e ekimler yapıldı. Plaklar 37 °C'de aerob ortamda 24-48 saat inkube edildi. Siyah parlak zon oluşturan koloniler stafilokok olarak değerlendirildi (Greenwood ve ark., 1984; Lancette ve Tatini, 1992). Rose-Bengal Chloramphenicol Agar'a ekimler yapıldı. Plaklar 25 °C'de aerob ortamda 5 gün inkube edildi. Yeşilimsi beyaz ipliksi üremeler küf, beyaz inci tanesi şeklindeki üremeler maya olarak değerlendirildi (Mislivec ve ark., 1992). Enterokokların tespiti için Slanetz and Bartley Medium'a ekimler yapıldı. Plaklar 37 °C'de aerob ortamda 24-48 saat inkube edildi. Vişne çürüğü rengindeki koloniler enterokok olarak değerlendirildi (Baumgard, 1993). Laktobasillerin aranması için LA Agara ekim yapıldı. 30 °C' de 48 saat anaerob inkubasyon sonunda inci tanesi şeklindeki koloniler laktobasil olarak değerlendirildi. LS agara ekim yapıldı, 30 °C'de 48 saat anaerob inkubasyon sonunda inci tanesi şeklindeki koloniler laktobasil olarak değerlendirildi ve sayıldı.

2.2.3. Diyarel Enterotoksin Oluşumunun Saptanması

Bacillus cereus suşları Brain Heart Infusion Broth' a (OXOID CM 225) bir öze dolusu inokule edilerek 32-37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 250 devir/dakika hızla 6-18 saat inkübe edilmelerini takiben karışım, 4 °C' de 20 dakika 900 devirde santrifüj edilerek veya 0,2-0,45 mikrometre gözenekli ve protein bağlama özelliği düşük filtreden (millipore SLVG) geçirilerek BCET-RPLA test kiti ile teste tabii tutuldu.

Deneysel aşamada çiğ köfteden toksin izole edilmesinde, 10 g örnek, 10 ml % 0,85'lik NaCl çözeltisi ile homojenize edildi, 30 dakika 900 g ile soğutmalı santrifüj yardımı ile fraksiyonlarına ayrılarak üstteki berrak ve yağ içermeyen sıvı kısım 0,2-0,45 mikrometre gözenekli ve protein bağlama kapasitesi düşük filtrelerden süzülüp, BCET -RPLA test kiti ile analiz edildi. Düğme görünümü negatif, ağ-kafes görünümü pozitif kabul edildi (Bridson, 1988; Harrigon, 1998).

2.2.4. Çiğ Köfte Örneklerinin pH Değerlerinin Ölçülmesi

Mikrobiyolojik analiz için örnek alınımını takiben, çiğ köfte örneklerinin pH değerleri elektronik pH metre (pH 900, NEL Elektronik, Ingold LOT 406-MG-DXK-57/25) ile ölçüldü.

2.2.5. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel yönden değerlendirilmesinde independent T-testi uygulandı (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 1994).

3.BULGULAR

Bu çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiş olup 1. aşamada geleneksel bir ürün olan çiğ köftenin *B. cereus* varlığı ve enterotoksin üretimi, ikinci aşamada ise *B. cereus* enterotoksin üreten suşunun deneysel olarak 4-25 °C' lerdeki 0., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde gelişimi ve toksin üretme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

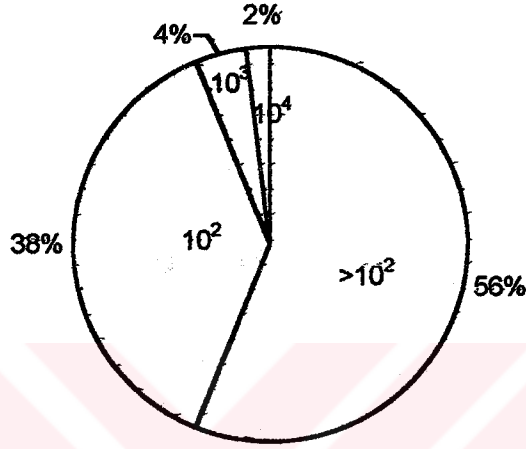
Çalışmanın ilk aşamasını oluşturan, Ankara' daki çeşitli restoran, market ve açıkta satılan toplam 50 çiğ köfte örneğinin % 44 (22/50)' ünde *B. cereus* pozitif olarak bulundu. Pozitif örneklerde *B. cereus* kontaminasyonu ortalama 2.55 log₁₀ kob/g, minimum 2.0 log₁₀ kob/g, maksimum 4.3 log₁₀ kob/g düzeylerde belirlendi (Çizelge 3.1; Şekil 3.1).

Toplam 50 örnekte ortalama aerob mezofil genel canlı sayısı 6.34 log₁₀ kob/g, laktobasil sayısı ortalama 5.33 log₁₀ kob/g, enterobakter sayısı ortalama 4.12 log₁₀ kob/g, koliform sayısı ortalama 3.76 log₁₀ kob/g, stafilokok-mikrokok sayısı ortalama 4.00 log₁₀ kob/g, enterokok sayısı ortalama 3.47 log₁₀ kob/g, *pseudomonas* sayısı ortalama 2.81 log₁₀ kob/g, maya sayısı ortalama 3.30 log₁₀ kob/g, küf sayısı ortalama 2.38 log₁₀ kob/g ve *B. cereus* sayısı ortalama 1.12 log₁₀ kob/g olarak saptandı (Çizelge 3.2; Şekil 3.2). Toplam 50 örneğin ortalama pH'sı 4.58 olarak belirlendi.

Çalışmada, *B.cereus* pozitif örneklerden elde edilen 22 suşun BCET-RPLA test kit ile yapılan enterotoksin tayininde % 63.63 (14/22)' ünün enterotoksin ürettiği belirlendi.

Çizelge 3.1. Ankara' da satışı sunulan çiğ köfte örneklerinde *B. cereus*' un dağılımı.

Numune sayısı (n)	Pozitif örnek sayısı (%)	Pozitif örneklerin oran ve dağılımı		
		10^2 kob/g (%)	10^3 kob/g (%)	10^4 kob/g (%)
50	22 (% 44)	19 (% 38)	2 (% 4)	1 (% 2)

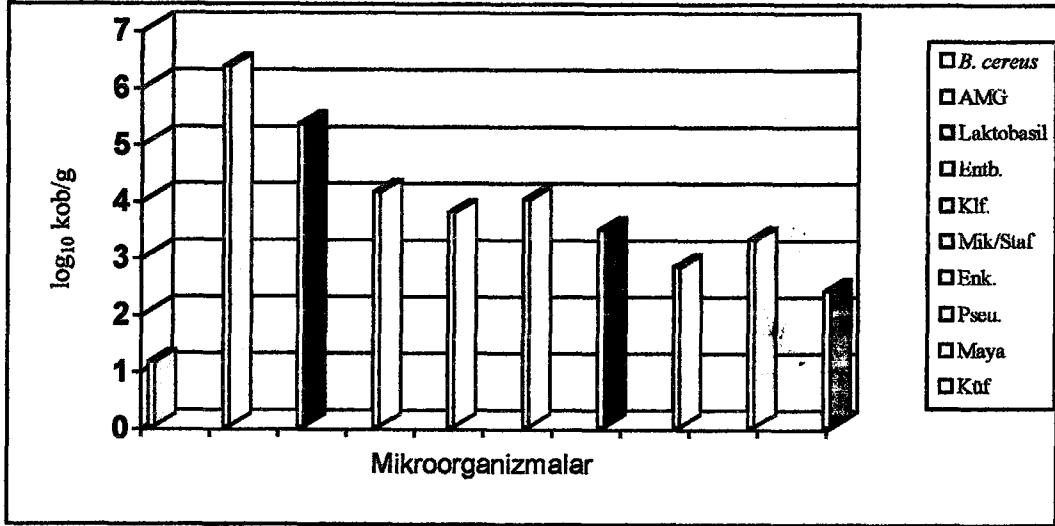


Şekil 3.1. Ankara' da satışı sunulan çiğ köfte örneklerinde *B. cereus*' un dağılımı (kob/g) (n:50).

Çizelge 3.2. Ankara' da satışı sunulan çiğ köfte örneklerinde mikroorganizma dağılımı.

Log ₁₀ kob/g	B.cer.	AMG	Lak.	Ent.b.	Koli.	S/M.	Entk.	Pseu.	Maya	Küf
Ort.	1,12	6,34	5,33	4,12	3,76	4,00	3,47	2,81	3,30	2,38
Min.	2,00	4,78	4,15	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	1,07	<1,00
Mak.	4,30	8,72	8,30	6,47	6,15	6,30	2,15	4,60	5,15	4,78

B.cer.: *B. cereus*; **AMG:** Aerob mezofil genel canlı; **Lak.:** Laktobasil; **Ent.b.:** Enterobakter; **Koli.:** Koliform; **S/M:** Stafilokok-mikrokok; **Entk.:** Enterokok; **Pseu.:** *Pseudomonas*; **Maya:** Maya; **Küf:** Küf.



Şekil 3.2. Çiğ köfte örneklerinin mikroorganizma dağılımı (n:50).

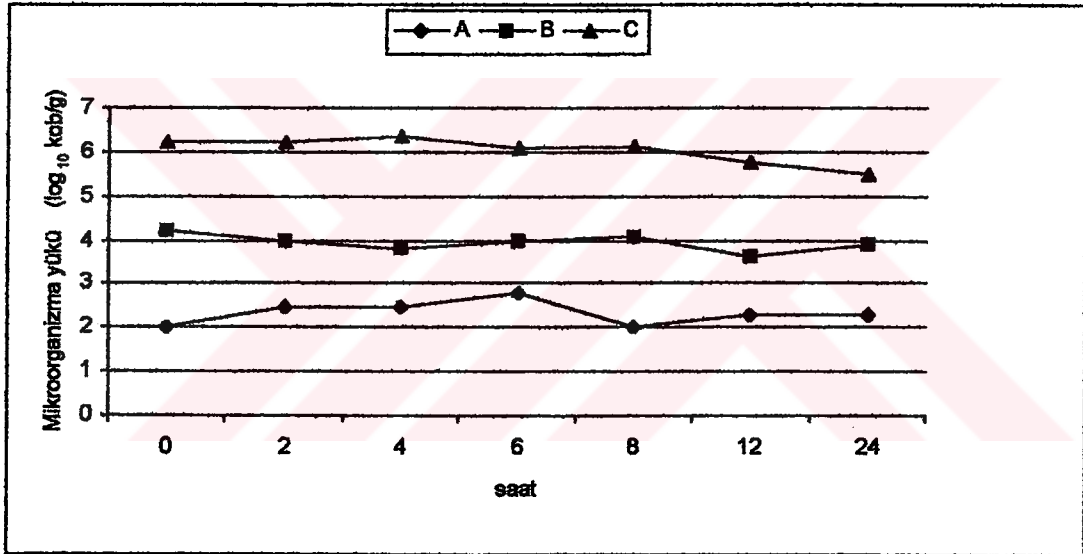
Çalışmanın deneysel aşamasında; çiğ köfte yapımında kullanılan kıyma ve ısıtılmış baharat numunelerinin her üç üretimde de *B. cereus* varlığı yönünden yapılan analizlerinde, ham maddelerin *B. cereus* içermediği belirlendi. Ayrıca kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında mikroflora yönünden önemli fark görülmemiştir.

Çiğ köfte hamuru, *B. cereus*' dan ari kontrol (K) grubu, *B. cereus* ile 10^2 kob/g (A grubu), 10^4 kob/g (B grubu) ve 10^6 kob/g (C grubu) düzeylerinde kontamine edilen toplam dört grup oluşturuldu. Bu grupların herbiri buzdolabı sıcaklığı (+4 °C) ve oda sıcaklığı (+25 °C) derecelerinde 24 saat boyunca 0., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde analiz edildi. Deneysel aşama üç kez tekrar edildi. Her üç üretimde 4 ve 25 °C' lerdeki 0., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerdeki *B. cereus* gelişim seyri Çizelge 3.3., 3.4., 3.5., 3.6., 3.7., 3.8. ve Şekil 3.3., 3.4., 3.5., 3.6., 3.7., 3.8.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Birinci deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (log₁₀ kob/g)

Saat	Gruplar		
	A	B	C
0	2,00	4,20	6,20
2	2,47	4,00	6,20
4	2,47	3,78	6,34
6	2,78	4,00	6,07
8	2,00	4,07	6,14
12	2,30	3,60	5,78
24	2,30	3,90	5,50

A: 10² kob/g *B. cereus*; B: 10⁴ kob/g *B. cereus*; C: 10⁶ kob/g *B. cereus*



Şekil 3.3. Birinci deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (log₁₀ kob/g)

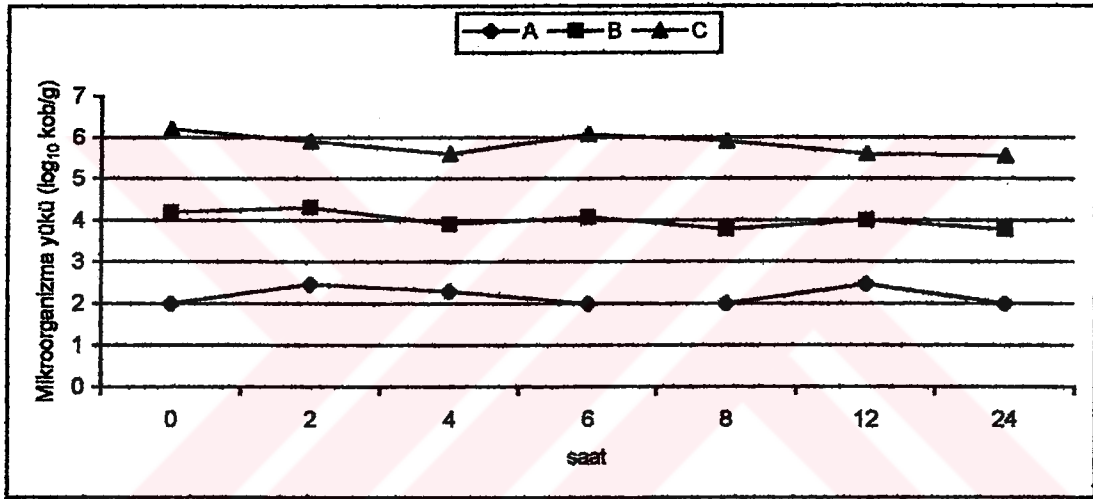
A: 10² kob/g *B. cereus*; B: 10⁴ kob/g *B. cereus*; C: 10⁶ kob/g *B. cereus*

Deneysel birinci çiğ köfte üretiminde 10², 10⁴ ve 10⁶ kob/g düzeylerinde inokule edilen ve +4 °C' de muhafaza edilen örneklerdeki *B. cereus* düzeyi başlangıçta sırasıyla 2.00, 4.20 ve 6.20 log₁₀ kob/g düzeylerinde iken 24. saatte 2.30, 3.90 ve 5.50 log₁₀ kob/g düzeylerinde saptandı. İstatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p>0.05$) (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.4. Birinci deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (\log_{10} kob/g)

Saat	Gruplar		
	A	B	C
0	2,00	4,20	6,20
2	2,47	4,30	5,90
4	2,30	3,90	5,60
6	2,00	4,07	6,07
8	2,00	3,78	5,90
12	2,47	4,00	5,60
24	2,00	3,78	5,55

A: 10^2 kob/g *B. cereus*; B: 10^4 kob/g *B. cereus*; C: 10^6 kob/g *B. cereus*



Şekil 3.4. Birinci deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (\log_{10} kob/g)

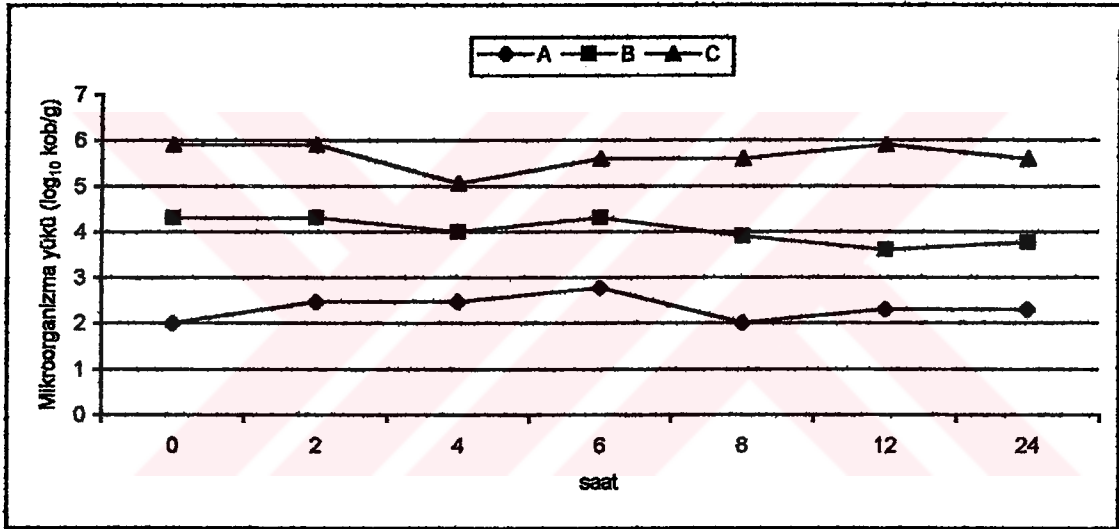
A: 10^2 kob/g *B. cereus*; B: 10^4 kob/g *B. cereus*; C: 10^6 kob/g *B. cereus*

Deneysel birinci çiğ köfte üretiminde 10^2 , 10^4 ve 10^6 kob/g düzeylerinde inokule edilen ve +25 °C' de muhafaza edilen örneklerdeki *B. cereus* düzeyi başlangıçta sırasıyla 2.00, 4.20 ve 6.20 \log_{10} kob/g düzeylerinde iken 24. saatte 2.00, 3.78 ve 5.55 \log_{10} kob/g düzeylerinde saptandı. İstatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p>0.05$) (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.5. İkinci deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (\log_{10} kob/g)

Saat	Gruplar		
	A	B	C
0	2,00	4,30	5,90
2	2,47	4,30	5,90
4	2,47	4,00	5,07
6	2,78	4,30	5,60
8	2,00	4,30	5,60
12	2,30	3,90	5,90
24	2,30	3,60	5,60

A: 10^2 kob/g *B. cereus*; B: 10^4 kob/g *B. cereus*; C: 10^6 kob/g *B. cereus*



Şekil 3.5. İkinci deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (\log_{10} kob/g)

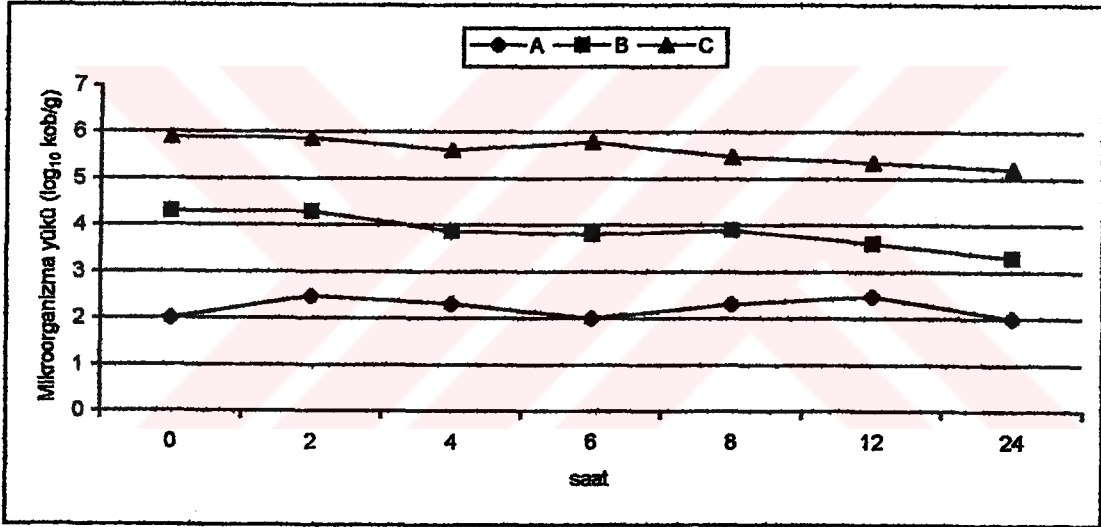
A: 10^2 kob/g *B. cereus*; B: 10^4 kob/g *B. cereus*; C: 10^6 kob/g *B. cereus*

Deneysel ikinci çiğ köfte üretiminde 10^2 , 10^4 ve 10^6 kob/g düzeylerinde inokule edilen ve +4 °C' de muhafaza edilen örneklerdeki *B. cereus* düzeyi başlangıçta sırasıyla 2.00, 4.30 ve 5.90 \log_{10} kob/g düzeylerinde iken 24. saatte 2.30, 3.60 ve 5.60 \log_{10} kob/g düzeylerinde saptandı. İstatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p>0.05$) (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.6. İkinci deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (\log_{10} kob/g)

Saat	Gruplar		
	A	B	C
0	2,00	4,30	5,90
2	2,47	4,30	5,87
4	2,30	3,87	5,60
6	2,00	3,80	5,78
8	2,30	3,90	5,47
12	2,47	3,60	5,34
24	2,00	3,30	5,20

A: 10^2 kob/g *B. cereus*; B: 10^4 kob/g *B. cereus*; C: 10^6 kob/g *B. cereus*



Şekil 3.6. İkinci deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (\log_{10} kob/g)

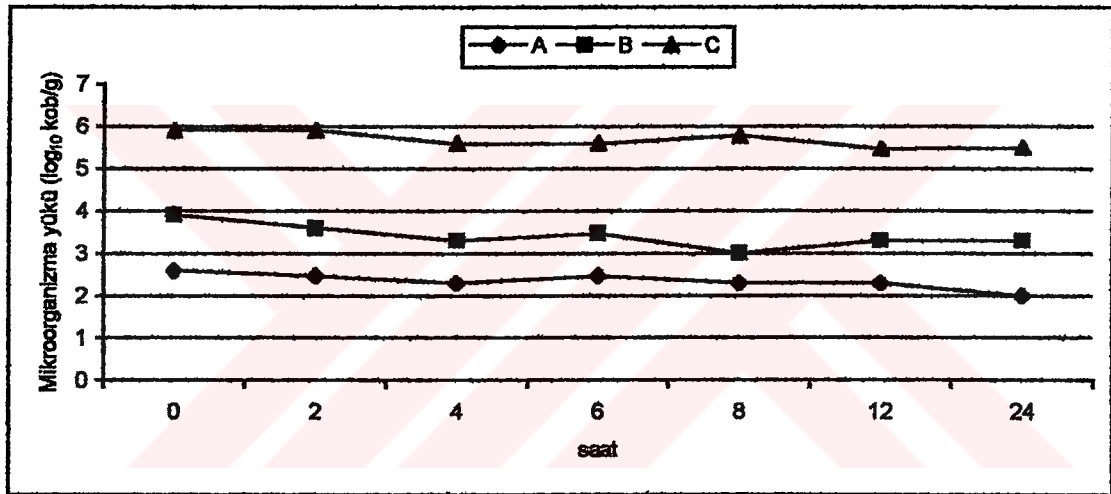
A: 10^2 kob/g *B. cereus*; B: 10^4 kob/g *B. cereus*; C: 10^6 kob/g *B. cereus*

Deneysel ikinci çiğ köfte üretiminde 10^2 , 10^4 ve 10^6 kob/g düzeylerinde inokule edilen ve +25 °C' de muhafaza edilen örneklerdeki *B. cereus* düzeyi başlangıçta sırasıyla 2.00, 4.30 ve 5.90 \log_{10} kob/g düzeylerinde iken 24. saatte 2.00, 3.30 ve 5.20 \log_{10} kob/g düzeylerinde saptandı. İstatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p>0.05$) (Çizge 3.6).

Çizelge 3.7. Üçüncü deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (log₁₀ kob/g)

Saat	Gruplar		
	A	B	C
0	2,60	3,90	5,90
2	2,47	3,60	5,90
4	2,30	3,30	5,60
6	2,47	3,47	5,60
8	2,30	3,00	5,78
12	2,30	3,30	5,47
24	2,00	3,30	5,50

A: 10² kob/g *B. cereus*; B: 10⁴ kob/g *B. cereus*; C: 10⁶ kob/g *B. cereus*



Şekil 3.7. Üçüncü deneysel çiğ köfte üretiminde +4 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (log₁₀ kob/g)

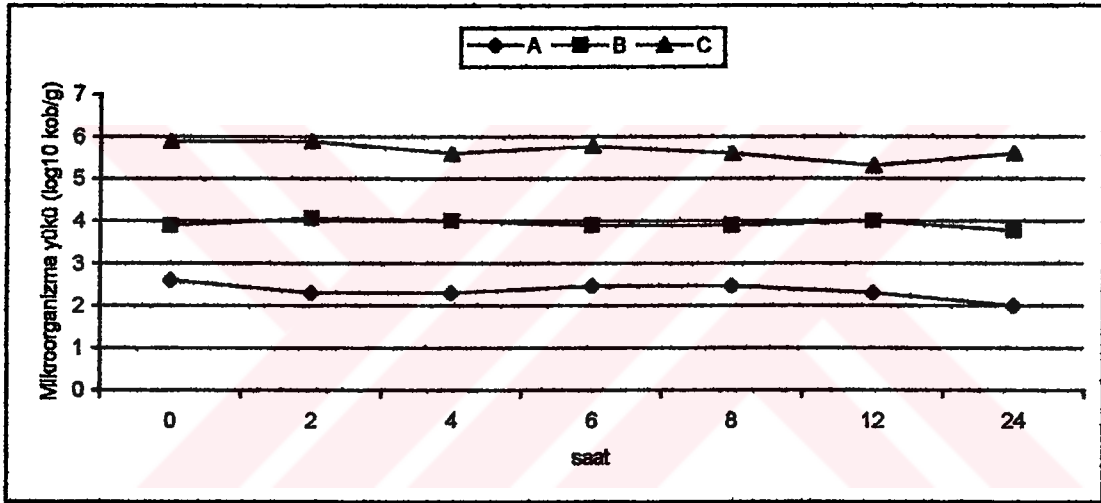
A: 10² kob/g *B. cereus*; B: 10⁴ kob/g *B. cereus*; C: 10⁶ kob/g *B. cereus*

Deneysel üçüncü çiğ köfte üretiminde 10², 10⁴ ve 10⁶ kob/g düzeylerinde inokule edilen ve +4 °C' de muhafaza edilen örneklerdeki *B. cereus* düzeyi sırasıyla başlangıçta 2.60, 3.90 ve 5.90 log₁₀ kob/g düzeylerinde iken 24. saatte 2.00, 3.30 ve 5.50 log₁₀ kob/g düzeylerinde saptandı. İstatistiksel açıdan önemsiz bulundu (p>0.05) (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.8. Üçüncü deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (\log_{10} kob/g)

Saat	Gruplar		
	A	B	C
0	2,60	3,90	5,90
2	2,30	4,07	5,90
4	2,30	4,00	5,60
6	2,47	3,90	5,78
8	2,47	3,90	5,60
12	2,30	4,00	5,30
24	2,00	3,78	5,60

A: 10^2 kob/g *B. cereus*; B: 10^4 kob/g *B. cereus*; C: 10^6 kob/g *B. cereus*



Şekil 3.8. Üçüncü deneysel çiğ köfte üretiminde +25 °C' de yer alan gruplarda *B. cereus*'un seyri (\log_{10} kob/g)

A: 10^2 kob/g *B. cereus*; B: 10^4 kob/g *B. cereus*; C: 10^6 kob/g *B. cereus*

Deneysel üçüncü çiğ köfte üretiminde 10^2 , 10^4 ve 10^6 kob/g düzeylerinde inokule edilen ve +25 °C' de muhafaza edilen örneklerdeki *B. cereus* düzeyi başlangıçta sırasıyla 2.60, 3.90 ve 5.90 \log_{10} kob/g düzeylerinde iken 24. saatte 2.00, 3.78 ve 5.60 \log_{10} kob/g düzeylerinde saptandı. İstatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p>0.05$). Yapılan her üç deneysel çiğ köfte üretiminde de +4 ve +25 °C' lerde *B. cereus*' un seyri istatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p>0,05$) (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.9. 4 °C'de muhafaza edilen kontrol grubu çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).

Mikroorganizmalar										
Saat	AMG	A.lak	Lak	Ent.b.	Koli	S/M	Ent.k.	Pseu.	Maya	Küf
0	4,40	2,45	3,25	1,15	<2,00	3,56	2,80	3,37	2,95	4,30
2	4,10	1,45	3,07	<2,00	<2,00	3,60	3,04	2,68	3,15	4,60
4	4,25	1,50	4,04	1,53	1,15	3,69	3,45	1,50	3,19	3,89
6	4,04	2,80	3,60	1,45	<2,00	3,69	3,25	1,57	3,30	4,84
8	4,57	1,95	4,40	1,50	1,15	3,64	2,84	1,65	3,32	4,37
12	4,15	2,80	4,53	1,30	<2,00	3,15	3,05	1,80	3,15	4,20
24	3,84	1,80	2,80	2,65	<2,00	2,87	<2,00	1,57	3,30	4,15

AMG: Aerob mezofil genel canlı; **A.lak.:** Aside dirençli laktobasil, **Lak.:** Laktobasil; **Ent.b.:** Enterobakter; **Koli.:** Koliiform; **S/M:** Stafilokok-mikrokok; **Entk.:** Enterokok; **Pseu.:** *Pseudomonas*; **Maya:** Maya; **Küf:** Küf.

Çizelge 3.10. 4 °C'de muhafaza edilen A grubu (10^2 kob/g *B. cereus* içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).

Mikroorganizmalar											
Saat	B.cer	AMG	A.lak	Lak	Ent.b.	Koli	S/M	Ent.k.	Pseu.	Maya	Küf
0	2,20	4,84	1,65	3,18	1,15	1,15	4,07	3,03	3,04	2,68	4,45
2	2,47	4,69	1,65	2,90	1,30	1,15	3,75	3,10	1,89	3,10	4,89
4	2,41	4,45	2,80	3,08	1,39	<2,00	4,25	2,96	1,50	3,43	4,90
6	2,67	4,69	1,65	3,80	1,20	1,15	4,10	3,40	1,62	3,53	4,75
8	2,10	4,47	2,80	3,45	1,30	1,15	4,19	3,10	1,89	3,30	4,75
12	2,30	4,60	3,10	3,52	1,76	1,30	3,95	2,92	1,95	3,30	4,75
24	2,20	4,35	4,10	3,19	1,57	<2,00	3,05	2,68	1,80	3,42	4,42

B.cer.: *B. cereus*; **AMG:** Aerob mezofil genel canlı; **A.lak.:** Aside dirençli laktobasil, **Lak.:** Laktobasil; **Ent.b.:** Enterobakter; **Koli.:** Koliiform; **S/M:** Stafilokok-mikrokok; **Entk.:** Enterokok; **Pseu.:** *Pseudomonas*; **Maya:** Maya; **Küf:** Küf.

Çizelge 3.11. 4 °C'de muhafaza edilen B grubu (10^4 kob/g *B. cereus* içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).

Mikroorganizmalar											
Saat	B.cer	AMG	A.lak	Lak	Ent.b.	Koli	S/M	Ent.k.	Pseu.	Maya	Küf
0	4,13	5,10	1,45	3,75	1,30	<2,00	3,90	3,15	3,89	3,10	4,84
2	3,96	4,75	1,57	3,45	1,30	1,80	3,92	3,45	2,95	2,80	4,34
4	3,69	4,80	3,02	3,84	1,60	<2,00	3,56	3,48	3,40	3,37	4,55
6	3,92	5,54	3,19	4,20	2,97	1,39	4,04	3,98	2,80	3,39	4,15
8	3,79	4,84	3,25	4,10	1,89	1,15	3,69	3,76	2,80	3,69	4,45
12	3,30	4,45	2,80	4,03	2,30	1,30	2,84	3,25	1,50	3,30	4,18
24	3,20	4,42	3,34	4,80	1,65	1,39	1,57	1,60	1,57	4,04	4,30

B.cer.: *B. cereus*; **AMG:** Aerob mezofil genel canlı; **A.lak.:** Aside dirençli laktobasil, **Lak.:** Laktobasil; **Ent.b.:** Enterobakter; **Koli.:** Koliform; **S/M:** Stafilokok-mikrokok; **Entk.:** Enterokok; **Pseu.:** *Pseudomonas*; **Maya:** Maya; **Küf:** Küf.

Çizelge 3.12. 4 °C'de muhafaza edilen C grubu (10^6 kob/g *B. cereus* içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).

Mikroorganizmalar											
Saat	B.cer	AMG	A.lak	Lak	Ent.b.	Koli	S/M	Ent.k.	Pseu.	Maya	Küf
0	6,00	6,18	2,75	3,85	1,15	1,15	3,65	2,99	3,18	3,45	3,30
2	6,00	6,15	2,54	3,96	1,57	1,15	3,60	3,03	3,39	2,95	4,54
4	5,67	6,34	2,65	4,69	1,65	1,15	3,54	2,65	2,99	3,19	4,60
6	5,75	6,40	3,32	4,95	2,68	1,15	3,69	2,89	2,97	3,10	4,30
8	5,84	6,40	3,45	4,69	1,80	1,15	3,62	3,30	3,19	3,07	4,54
12	5,71	6,53	4,15	5,45	1,95	1,15	3,10	3,40	3,10	3,87	4,95
24	5,52	6,89	5,00	6,07	1,45	1,80	2,87	<2,00	2,03	3,68	4,04

B.cer.: *B. cereus*; **AMG:** Aerob mezofil genel canlı; **A.lak.:** Aside dirençli laktobasil, **Lak.:** Laktobasil; **Ent.b.:** Enterobakter; **Koli.:** Koliform; **S/M:** Stafilokok-mikrokok; **Entk.:** Enterokok; **Pseu.:** *Pseudomonas*; **Maya:** Maya; **Küf:** Küf.

Çizelge 3.13. 25 °C'de muhafaza edilen kontrol grubu çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).

Mikroorganizmalar										
Saat	AMG	A.lak	Lak	Ent.b.	Koli	S/M	Ent.k.	Pseu.	Maya	Küf
0	4,84	2,45	3,25	1,15	<2,00	3,56	2,80	3,37	2,95	4,15
2	4,69	1,39	3,30	1,48	<2,00	3,42	2,77	3,22	3,03	4,30
4	4,69	1,67	4,06	1,80	1,30	3,95	3,10	1,65	3,30	4,60
6	4,75	1,65	4,45	1,65	1,15	3,89	2,75	1,80	3,37	4,60
8	4,89	2,30	4,45	1,53	1,45	3,60	2,84	1,89	3,22	4,53
12	5,03	3,69	4,65	2,80	1,30	3,49	1,15	1,73	4,34	4,38
24	6,48	3,62	5,83	3,87	1,15	3,15	1,15	1,50	4,05	4,60

AMG: Aerob mezofil genel canlı; A.lak.: Aside dirençli laktobasil, Lak.: Laktobasil; Ent.b.: Enterobakter; Koli.: Koliform; S/M: Stafilokok-mikrokok; Entk.: Enterokok; Pseu.: *Pseudomonas*; Maya: Maya; Küf: Küf.

Çizelge 3.14. 25 °C'de muhafaza edilen A grubu (10^2 kob/g *B. cereus* içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).

Mikroorganizmalar											
Saat	B.cer	AMG	A.lak	Lak	Ent.b.	Koli	S/M	Ent.k.	Pseu.	Maya	Küf
0	2,20	4,84	1,65	3,18	1,15	1,15	4,07	3,03	3,04	3,18	4,45
2	2,41	4,64	1,53	3,60	1,30	1,15	4,20	3,65	3,04	3,62	4,60
4	2,30	4,54	2,39	3,30	1,50	1,50	3,78	3,45	3,60	3,69	4,75
6	2,16	4,75	2,00	4,10	1,50	1,15	4,54	3,22	1,65	3,95	4,54
8	2,25	4,70	3,33	4,27	2,80	2,30	3,80	2,80	1,65	3,77	4,60
12	2,41	5,35	3,92	4,45	2,80	1,15	4,04	3,18	1,80	3,72	4,33
24	2,00	7,34	6,15	6,80	3,80	1,15	5,27	3,75	1,80	3,95	4,75

B.cer.: *B. cereus*; AMG: Aerob mezofil genel canlı; A.lak.: Aside dirençli laktobasil, Lak.: Laktobasil; Ent.b.: Enterobakter; Koli.: Koliform; S/M: Stafilokok-mikrokok; Entk.: Enterokok; Pseu.: *Pseudomonas*; Maya: Maya; Küf: Küf.

Çizelge 3.15. 25 °C'de muhafaza edilen B grubu (10^4 kob/g *B. cereus* içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).

Mikroorganizmalar											
Saat	B.cer	AMG	A.lak	Lak	Ent.b.	Koli	S/M	Ent.k.	Pscu.	Maya	Küf
0	4,13	5,10	1,45	3,75	1,30	<2,00	3,90	3,15	3,89	3,10	4,84
2	4,22	4,89	2,30	4,10	1,39	1,39	3,68	3,30	2,30	3,60	4,80
4	3,92	5,18	3,15	3,65	1,45	1,15	3,69	2,95	1,65	3,10	4,34
6	3,92	5,18	3,60	4,04	1,60	1,15	3,78	2,60	1,92	3,62	4,84
8	3,86	5,18	3,69	4,10	2,95	1,30	3,54	2,45	1,69	3,80	4,55
12	3,86	5,30	4,77	5,30	3,37	1,15	3,45	2,69	1,65	4,32	4,80
24	3,62	7,07	6,69	6,97	3,45	1,45	4,15	1,15	1,45	5,54	4,19

B.cer.: *B. cereus*; **AMG:** Aerob mezofil genel canlı; **A.lak.:** Aside dirençli laktobasil, **Lak.:** Laktobasil; **Ent.b.:** Enterobakter; **Koli.:** Koliform; **S/M:** Stafilokok-mikrokok; **Entk.:** Enterokok; **Pscu.:** *Pseudomonas*; **Maya:** Maya; **Küf:** Küf.

Çizelge 3.16. 25 °C'de muhafaza edilen C grubu (10^6 kob/g *B. cereus* içeren) çiğ köfte örneklerinin ortalama mikroorganizma dağılımı (\log_{10} kob/g).

Mikroorganizmalar											
Saat	B.cer.	AMG	A.lak	Lak	Ent.b.	Koli	S/M	Ent.k.	Pscu.	Maya	Küf
0	6,00	6,18	2,75	3,85	1,15	1,15	3,65	2,99	3,18	3,30	4,45
2	5,89	5,78	2,80	4,28	3,04	<2,00	3,42	2,95	3,19	3,45	4,45
4	5,60	6,04	2,80	4,53	2,65	1,30	3,57	2,97	3,04	3,30	4,45
6	5,87	5,92	3,45	4,53	2,77	2,60	3,95	2,97	2,82	3,45	4,45
8	5,65	5,87	3,45	4,95	1,65	1,15	3,67	2,84	1,80	3,54	4,30
12	5,41	6,40	4,15	5,17	3,10	1,15	3,85	2,78	1,65	3,37	4,69
24	5,45	7,44	5,84	5,87	2,15	<2,00	4,10	1,15	2,15	3,95	4,60

B.cer.: *B. cereus*; **AMG:** Aerob mezofil genel canlı; **A.lak.:** Aside dirençli laktobasil, **Lak.:** Laktobasil; **Ent.b.:** Enterobakter; **Koli.:** Koliform; **S/M:** Stafilokok-mikrokok; **Entk.:** Enterokok; **Pscu.:** *Pseudomonas*; **Maya:** Maya; **Küf:** Küf.

Oluşturulan; +4 °C ve +25 °C 'lerde 10^2 , 10^4 , 10^6 kob/g düzeylerinde inokule edilen gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmede *B. cereus* yönünden gruplar arası fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.01$).

B. cereus 'un gelişimi yönünden süreler arası farklılık istatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p>0.05$).

Kontrol, A ve B gruplarında +4 °C' de, incelenen mikroorganizma tiplerinde süreler arası fark istatistiksel açıdan önemsiz bulundu ($p> 0.05$) (Çizelge 3.9, 3.10, 3.11).

Kontrol grubu, +25 °C' de aerob mezofil genel canlı (AMG) 0. saatte 4,84 \log_{10} kob/g' ken 24. saatte 6,48 \log_{10} kob/g, 24. saatte, mayaların 0. saatte 2,95 \log_{10} kob/g iken, 12. ve 24. saatlerde sırasıyla 4.05, 4,34 \log_{10} kob/g olarak, farkistatistiksel açıdan önemli görüldü ($p < 0.01$) (Çizelge 3.13).

A grubunda + 25 °C ' de 0. saatte AMG 4.89, laktobasiller 3.18, aside dirençli laktobasiller 1.65 \log_{10} kob/g düzeylerinde iken, 24. saatte sırasıyla 7.34, 6.80, 6.15 \log_{10} kob/g olarak belirlendi, istatistiksel açıdan fark önemli bulundu ($p<0.05$) (Çizege 3.14).

B grubunda, +25 °C 'de 0. saatte AMG, laktobasil ve aside dirençli laktobasiller sırasıyla 5.15, 3.75, 1.45 \log_{10} kob/g iken 12. saatte laktobasil ve aside dirençli laktobasiller 5.30, 4.47 \log_{10} kob/g ve 24. saatte ise sırasıyla 7.07, 6.97, 6.69 \log_{10} kob/g düzeylerine yükseldiği belirlendi, istatistiksel açıdan fark önemli bulundu ($p<0.05$) (Çizelge 3.15).

C grubunda, +4 °C' de 0. saatte enterokoklar ve aside dirençli laktobasiller 2.99, 2.75 \log_{10} kob/g iken, 24. saatte sırasıyla 0 ve 5.00 \log_{10} kob/g olarak belirlendi, istatistiksel açıdan önemli bulundu ($p<0.05$) (Çizelge 3.12).

C grubunda, + 25 °C' de 0. saatte AMG ve aside dirençli laktobasiller sırasıyla 6.18 ve 2.75 \log_{10} kob/g iken, 24. saatte 7.44 ve 5.84 \log_{10} kob/g düzeyinde belirlendi ve istatistiksel açıdan fark önemli bulundu ($p<0.05$) (Çizelge 3.16).

Ayrıca, A, B ve C gruplarının etkisi arındırıldıktan sonra +4 ve +25 °C' ler arasında;

A grubunda, 12. ve 24. saatlerde AMG, 8. ve 24. saatlerde laktobasillerin gelişimi yönünden, B grubunda, 6. saatte küf, 8. saatte enterokoklar, 12. saatte maya ve laktobasiller, 24. saatte AMG ve laktobasillerin gelişimi yönünden, C grubunda, 12. saatte enterokoklar, 24. saatte aside dirençli laktobasillerin gelişimi yönünden istatistiksel açıdan önemli bulundu ($p < 0.05$).

Deneyisel çalışmada yapılan çiğ köfte örneklerinin +4 ve +25 °C' lerde 0., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde incelenen mikroorganizmaların ortalama değerleri Çizelge 3.9., 3.10., 3.11., 3.12., 3.13, 3.14., 3.15. ve 3.16.' da gösterilmiştir.

Deneyisel üretilen çiğ köfte hamurlarının pH takibinde sırasıyla başlangıçta ortalama; pH 5.4, 24. saat sonunda ise ortalama 4 °C'de 5.6, 25 °C'de 5.8 olarak tespit edildi.

Deneyisel olarak enterotoksijenik *B.cereus* NCTC-11145 referans suşu ile kontamine edilen çiğ köfte örneklerinin mikrobiyolojik analizlere paralel olarak, BCET-RPLA test kit ile yapılan enterotoksin testinde, kontrol, A grubu (10^2 kob/g) ve B grubunda (10^4 kob/g) +4 ve +25 °C' lerde muhafaza edilen örneklerde toksin oluşumu tespit edilemedi. + 25 °C'de muhafaza edilen ve 10^6 kob/g seviyelerinde enterotoksin oluşturma yeteneği bilinen *B. cereus* suşu ile kontamine edilen (C grubu) gruplarda 8., 12. ve 24. saatlerde enterotoksin (+) sonuç alınırken; (Çizelge 3.17) + 4 °C'de muhafazada toksinin oluşumu saptanmadı.

Çizelge 3.17. 25 °C' de BCET-RPLA test kitiyle yapılan enterotoksinin belirlenmesi.

Saat	A _{1,2,3}	B _{1,2,3}	C _{1,2,3}
0	---	---	---
2	---	---	---
4	---	---	---
6	---	---	---
8	---	---	+--
12	---	---	+++
24	---	---	+++

A: 10² kob/g; B: 10⁴ kob/g; C: 10⁶ kob/g 1,2,3 :Deneysel üretim sayısı

4.TARTIŞMA

Baharat ve baharat katkılı gıda maddelerinde *B. cereus*' dan kaynaklanan kontaminasyonlar her zaman mümkün olabilmektedir (Konuma ve ark.,1988; Kamat ve ark.,1989;Van Netten ve ark., 1990;Deambrosis ve Silva,1992). Çiğ köfte de hem baharat katkılı bir gıda olması hem de hazırlanması, muhafazası ve tüketim şekli olarak *B. cereus*' un risk oluşturabileceği ve halk sağlığı sorunları oluşturabilecek bir üründür.

Bu çalışmada ISO 7932 (Anon, 2000) tarafından geliştirilen yönteme bağlı kalınarak, *B. cereus* izolasyonu yapılmış ve identifikasyon amaçlı biyokimyasal testler Bergey's Manuel (Sneath, 1988) esas alınarak seçilmesi ve uygulanması; geleneksel bir ürün olan çiğ köftele ait bir standart olmaması nedeniyle, ürüne özgü oluşturacak standartlara temel teşkil etmesi amaçlanan çalışmaya uygun bir tercihtir. Bu yöntemin seçilmesindeki amaç; ISO standartlarının uluslar arası düzeyde hem güvenilir hem de her ülkede pratik olarak kullanılan bir klasik kültür tekniği olmasındandır. Yapılan çalışmalarda *B. cereus* izolasyonu için çok farklı besi yerleri olmasına rağmen, kullanılan MYP mediumun *B. cereus* türlerinin izolasyonunda selektivitesinin yüksek olmasıdır.

Enterotoksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesinde kullanılan BCET-RPLA test kiti, polistiren lateks partikülleri ile saflaştırılmış *B. cereus* diyarel enterotoksini ile immunize edilmiş tavşanlardan elde edilen antiserumla duyarlı hale getirilmiştir. Bu lateks test partikülleri benzer enterotoksinlerin varlığında aglütünasyonu oluşturur. Kontrol reaktifi ise immunize edilmeyen tavşan globulinleri ile duyarlı hale getirilmiş lateks partikülleri içerir. Testin duyarlılığının 2 ng/ml olduğu, 1/1 oranında seyreltilerek hazırlanan gıda örneğinde duyarlılığın 4 ng/g (Brett, 1998) olması ve yine yapılan literatür taramalarında duyarlılığının yüksek olması ve kullanımının pratik olması yanında, testlerde oluşabilecek hatalı pozitif ve negatif reaksiyonların test hassasiyeti üzerinde çok düşük düzeylerde saptanmış olması ve

daha ileri teknikler olan PCR, ELISA ve diğer testlere göre maliyetinin testin hassasiyeti yanında ucuz olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Pratikte kullanılan test kitlerinde enterotoksijenik *B. cereus* suşları ile yapılan çalışmalarda BCET-RPLA' nın intoksijenite açısından önem taşıyan hemolizin BL' nin L₂ komponentini saptadığı; Tecra (Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay) test kitinin ise iki enterotoksin üretmeyen suşu saptadığı bildirilmiştir (Beecher ve Wong, 1994).

Enterotoksijenik *B. cereus* kaynaklı zehirlenme olgularının bildirildiği bir çok çalışmada *B. cereus*' un MYP agarda 30 °C' de üretildiği (Harmon ve Kautter, 1991) ve BCET-RPLA test kitiyle enterotoksin pozitif bulunduğu belirtilmektedir (Kramer ve Gibbert, 1989).

Yapılan çalışmada % 44 (22/50) oranında *B. cereus* izole ve identifiye edilmiştir. Bu oran oldukça yüksektir. Sonuçlar, Küplülü ve ark.'nın (2000) % 46'lık bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Aksu ve Ergün (1995) % 29.1' lik bulgularından ise yüksektir. Sonuçların farklılık göstermesi hammadde, hazırlama koşulları ve hijyen şartlarının farklılığından kaynaklanabilir.

Çiğ köfte yapımında kullanılan temel katkı maddelerinin özellikle de baharatın *B. cereus* ile kontaminasyonunun yüksek olması; yaptıkları çalışmalarda, Konuma ve ark.(1988) baharatın % 39.7' sinin, Kamat ve ark.(1989) % 30' unun, Van Netten ve ark., (1990) % 42' sinin, Deambrosis ve Silva (1992) % 41' inin *B. cereus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle yöresel bazı farklılıklara rağmen çiğ köftede kırmızıbiber ve karabiber tercih edilen temel baharatlardır ve *B. cereus* ile kontaminasyon oranları yüksek baharat türleridirler; karabiber' in Pafumi (1986) % 81.4' ünde 10^2 - 10^5 kob/g, Erol ve ark.(1999) % 80' inde 10^2 kob/g, Ağaoğlu ve ark. (1999a) % 100 oranında ortalama 10^3 kob/g düzeylerde *B. cereus* izole ettiklerini bildirmişler; kırmızıbiberde Bhat ve ark.(1987) 1.2×10^2 - 1.0×10^3 kob/g düzeylerde, Erol (1999) % 44' ünde 10^2 kob/g, Ağaoğlu ve

ark.(1999a) 6.0×10^2 kob/g pul kırmızıbiberde 6.3×10^2 kob/g düzeylerde *B. cereus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Çiğ köftenin ham maddelerinden biri olan çiğ etin *B. cereus* ile kontaminasyonu baharata göre daha azdır fakat yine de risk faktörüdür; Hefnavy ve ark., (1984) kıyma örneklerinin % 18' inin, Komuma ve ark.(1988) % 6.6' sının, Ternstöm ve Molin (1987) sığır etinde % 11' inde *B. cereus* saptamışlardır.

Baharat ve et ile hazırlanmış yemekler *B. cereus* yönünden riskli ürünlerdir. Bachhil ve Jaiswal (1988) köri ile hazırlanmış yemeklerde % 35 oranında *B. cereus* izole ettiklerini ve bu suşların % 60' ının enterotoksijenik *B. cereus* olduğunu bildirmişlerdir. Bryan (1988) ABD' de 1977-1984 yılları arasında görülen *B. cereus* kaynaklı gıda zehirlenmeleri olgularının % 14.2 oranında baharat ağırlıklı olduğu bilinen Meksika yemeklerinin oluşturduğunu bildirmiştir. Bu oranların çalışmada saptanan % 44' lük orana göre daha düşük görülmesi ısı işleminin uygulanmamış olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Ankara' da satışa sunulan çiğ köfte örneklerinde *B. cereus* izole edilen suşlar ortama 10^2 - 10^4 kob/g seviyelerinde bulunurken, enterotoksin oluşturma oranın % 63.63 (14/22) gibi yüksek bir sonuç vermesi, Tan ve ark. (1997)' nin gıda maddelerinde enterotoksin oluşumu için *B. cereus* düzeyinin daima $>10^5$ kob/g olması gerektiğini ve *B. cereus* kontaminasyonunun daha düşük seviyelerde olmasının enterotoksin oluşturmayaçağı anlamına gelmediğini bildirmeleri sonuçlarımızı destekler şekildedir.

Çiğ köfte örneklerinde *B. cereus* kontaminasyonu ortalama $2.55 \log_{10}$ kob/g olarak saptanmıştır, bu düzey toksin oluşumu için yeterli olmamasına rağmen; Granum' un (1994), bir çok ülkede düşük seviyelerde izole edilen *B. cereus* suşlarının en az yarısının enterotoksin pozitif olduğunu bildirdiği gibi bu çalışma sonuçlarını desteklemektedir.

Deneysel çiğ köfte üretiminde toksin oluşumunun sadece C grubunda (10^6 kob/g) tespit edilmesi, diğer gruplarda etkenin toksin oluşturabilecek düzeylere ($\geq 10^5$ kob/g seviyelere) ulaşamamalarından ileri gelmektedir. Bu sonucu destekler şekilde, gıdada 10^5 kob/g vejetatif *B. cereus* bulunmasının gıda zehirlenmesi olgusu için yeterli olduğu bildirilmektedir (Granum ve Lund,1997). Beuchat ve ark.(1997) et ekstratlarında yaptıkları çalışmalarında $5.85 \log_{10}$ kob/g *B. cereus* ' dan az üremelerde enterotoksin oluşumunu saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Deneysel çiğ köfte üretiminde $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 24 saatlik muhafaza boyunca grupların hiç birinde toksin oluşumu saptanamazken, C grubunda $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de toksin oluşumu gözlenmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak, Mahakarnchanakul ve Beuchat, (1999) yaptıkları çalışmada *B. cereus*' un psikotrofik ve mezofilik suşlarının patates ezmesi ve tavuk suyuna % 0,2- 4 NaCl ilave edilerek, psikotroflar 30, 37 ve $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ' lerde, mezofilik suşları 30, 40 ve $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ' lerde incelemiştir. Her iki suşda NaCl içermeyen ve % 2 NaCl içeren ortamlarda 30, 37 ve $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ' lerde 2 gün inkubasyonda ürerken, maksimum enterotoksin (1024 ng/g) mezofilik suş tarafından 30 ve $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ' lerde meydana gelmiştir. Psikotrofik suş gıdada 10^7 kob/g seviyelerde, NaCl eklenmemiş ve % 2 NaCl içeren ortamda $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ürerken, bu suşun en yüksek enterotoksin (1024 ng/g) oluşumunun $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de % 0,7- 2 NaCl içeren tavuk suyunda, düşük toksin oluşumunun da (4-16 ng/g) $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de tavuk suyunda gözlendiği bildirilmiştir. Mezofilik suşda en yüksek toksin üretimi (1024 ng/g) $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de % 4 NaCl, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de % 0,7 NaCl içeren tavuk suyunda saptandığı, patates ezmesinde toksin üretiminin hiçbir ortamda saptanmadığı bildirilmiştir.

Deneysel çiğ köfte üretiminde C grubunun (10^6 kob/g) $+25 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de muhafaza edilen grubunda toksin oluşumu gözlenirken; $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de muhafazada toksin oluşumunun saptanamaması Van Netten ve ark.'nın (1990) psikotrofik *B. cereus* suşlarının enterotoksin üretimi üzerine yaptıkları çalışmada üreme ve toksin üretiminin engellenmesi için sıcaklığın $+4 \text{ }^\circ\text{C}$, pH' nın pH 5' e düşürülmesi gerektiğini, benzer şekilde (Jaquette ve Beuchat (1998), $8 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 72 saat ürettikleri etkende enterotoksin oluşumunun saptanamadığı Dufrenne ve ark.(1995), farklı gıda maddeleri ve gıda zehirlenme olgularından izole ettikleri 12 *B. cereus* suşunun $<7 \text{ }^\circ\text{C}$

de üreyebildiklerini ve gelişim zamanının 9.4 saatten 75 saate kadar bir sürede olduğunu saptadıklarını bildirmeleri, bu çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Üretiminden hemen sonra tüketilmesi gereken çiğ köftenin, ticari olarak üretildiği yerlerde hijyenik olmayan şartlarda hazırlandığı ve uzun süre uygun olmayan ortamlarda genellikle açıkta, ortam ısılarında bekletildiği bilinmektedir. Bu amaçla, deneysel çalışmada 24 saatlik süre seçilmiştir.

Deneysel çiğ köfte üretiminde 4 °C'de C grubunda toksin oluşumunun saptanamaması muhafaza süresinin kısıtlı olduğundan (24 saat) kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda 4 °C'de 7 günde toksin oluşumunun gözlemlendiği bildirilmiştir (Granum ve Lund (1997). 24 saat boyunca *B. cereus*' un gelişimi takip edilmiş ve dikkate değer bir gelişim veya değişiklik tespit edilememiştir. 24 saat sonunda aerob genel canlı sayısına paralel şekilde laktobasil sayısında bir artış gözlemlenmiştir; fakat *B. cereus* 'un üremesini engelleyebilecek ($\text{pH} \leq 5$) seviyelere (Van Netten ve ark.,1990) kadar pH düşüşüne neden olacak süre olmadığı için baskılayıcı etki oluşturamadığını düşündürmektedir. Bostan ve Aksu (1995), beyaz peynirlerin olgunlaşma şartlarının *B. cereus*' un yaşamını sürdürmesine izin vermediğini, özellikle laktik asit bakterilerinin *B. cereus*' un gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çiğ köftelerin mikrobiyolojik analizleri sonucunda pek çok mikroorganizma ile yoğun şekilde kontamine oldukları belirlenmiştir. Çiğ köftelerin yapımında kontamine ham madde kullanımı, hijyenik olmayan şartlarda hazırlanması ve uygun olmayan sıcaklıklarda muhafaza edilmelerine bağlı olarak saptanan bu sonuçlar, Arslan ve ark. (1992) Elazığ' da tüketime sunulan 45 adet çiğ köftenin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesine yönelik yaptıkları bir çalışmada aerob genel canlı sayısının 25 °C 'de ortalama 1.4×10^6 kob/g, 37 °C' de 4.6×10^5 kob/g, koliform sayısının 8.7×10^4 kob/g, fekal streptokok sayısının 1.7×10^4 kob/g, maya sayısının 2.4×10^4 kob/g, küf sayısının 1.9×10^5 kob/g, koagülaz (+) stafilokok

sayısının 1.0×10^3 kob/g olduğunu bildirmişlerdir. Koliform ve fekal streptokok örneklerin sırasıyla % 55,5' inde ve % 15,5' inde 10^5 - 10^6 arasında saptamışlardır. Çiğ köftelerin önemli sayılabilecek derecede bakteri yüküne sahip olduğu ve taze gıdalar için önerilen standartlara uymadığı sonucuna varmışlardır. Bu çalışmaların sonuçları; çalışmanın birinci aşamasında Ankara' da tüketime sunulan çiğ köfte örneklerinin genel mikroorganizma dağılımında elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Görülen küçük farklılıklar, çiğ köfte örneklerinin ham maddelerinin ve hazırlama koşullarının farklılığından kaynaklanabilir.

Deneysel çalışmada çiğ köftenin materyal olarak seçilmesinde geleneksel bir ürün olması, çiğ olarak tüketilmesi, standardının olmaması yanında hazırlama şeklinin uygunluğu da önemli rol oynamıştır. Çiğ köftelerde deneysel olarak Stafilocok ve Salmonella gibi önemli patojenler üzerinde yapılan bazı çalışmalar sonucunda; Erol ve ark. (1993) A tipi enterotoksin oluşturan *Staphylococcus aureus* ' un çiğ köftede üreme ve toksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesi amaçlı deneysel çalışmalarında, çiğ köfte numunelerinde başlangıçta 6.0×10^5 kob /g olan aerob genel canlı sayısının 24 saatlik muhafaza süresi sonunda 1.8×10^7 kob/g 'a ulaşırken aerob spor oluşturan mikroorganizmaların 10^5 kob/g seviyesinde değişmeden kaldığını, aside dirençli laktobasiller' in aerob genel canlı sayısına paralel bir artışla 5.5×10^3 kob/g' dan 1.2×10^7 kob/g 'a ulaşarak dominant florayı oluşturduğunu, hijyen indikatörü olarak kabul edilen enterobakteriler ve koliformların sayısı da sırasıyla 1.0×10^4 kob/g ve 3.4×10^3 kob/g ' dan ortalama 8.0×10^5 kob/g ' a ulaştığı, enterokoklar 2.0×10^2 kob/g ' dan 1.2×10^3 kob/g 'a yükselirken, pseudomonasların sayısında aw ' deki düşüğe bağlı sınırlı bir azalma gözlemlendiği; *S. aureus* 'un başlangıçta 3.0×10^3 , 3.0×10^4 , 3.0×10^5 kob/g seviyelerinde kontamine edilen I., II. ve III. grup çiğ köfte numunelerinin 0. saatte gerçekleştirilen ekimlerinde sırasıyla 1.0×10^3 , 8.0×10^3 ve 8.0×10^4 kob/g *S. aureus* bulunurken, 24. saat sonunda tüm gruplarda sınırlı bir azalma sırasıyla 2.0×10^2 , 2.2×10^3 ve 2.0×10^4 kob/g seviyelerine düştüğü, numunelerin hiçbirinde toksin oluşturmadığının saptandığını bildirmişlerdir. Göktan ve Tuncel (1988) çiğ köftede katkı maddelerinin salmonellanın üremesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında aerob genel canlı sayısının 30. dakika ile 24. saatler arasında 5.6×10^5 kob/g 'dan 1.9×10^5 kob/g değerine düştüğünü, çiğ

köfte hamuruna inokule edilen *Salmonella typhimurium* sayısının da 48 saatlik muhafaza süresi içerisinde hemen hemen başlangıç düzeylerinde kaldığını saptadıklarını bildirmişlerdir

Sonuç olarak, geleneksel bir ürün olan, hijyenik olmayan şartlarda hazırlanan, uygun olmayan ortam ve sürelerde muhafaza edilen ve çiğ olarak tüketilen çiğ köfte, özellikle temel katkı maddeleri olan baharatın yoğun şekilde kontamine olduğu *B. cereus* ve toksini açısından halk sağlığı için risk oluşturmaktadır.

5.SONUÇ

Elde edilen veriler çerçevesinde, ülkemiz şartlarında hazırlanıp tüketime sunulan ve hiçbir standarda sahip olmayan; üstelik bileşiminde kullanılan çiğ et ve baharat gibi özellikle çalışma konumuzun temelini oluşturan *B. cereus* olmak üzere pek çok patojen yönünden kontaminasyon riski olan çiğ köfte halk sağlığı açısından potansiyel risk içermektedir.

Özellikle çiğ olarak tüketilmesi, ham madde ve katkı maddelerinin hijyenik kalitesi, hazırlama şartları, muhafaza koşullarının ve üretimden tüketime kadar uyulması gerekli temel hijyen kuralları, bekletme süreleri büyük önem taşımaktadır.

Herşeyden önce, çiğ köfte standardı olmaması; aynen *B. cereus* gibi hem spor hemde toksin oluşturabilme yeteneği olan önemli bir patojene yönelik hazır çorbalar dışında hiçbir standartta limit değer olmaması; her ne kadar Türk Gıda Maddeleri Tüzüğünde sadece patojen mikroorganizma bulunmayacağına dair bir hüküm bulunduğu için *B. cereus*' un ülkemizde de gıda maddelerinde bulunmaması gerekliliği olsada; en önemli sorundur ve buna yönelik çalışmalar yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Çiğ köftede *B. cereus*' un gelişimi ve toksin oluşturma şartlarının; ürünün kontaminasyon düzeyi, muhafaza koşulları ve süresine bağlı olarak değiştiği saptanmıştır. Özellikle yüksek kontaminasyon düzeyleri (10^5 ve üstü) ayrıca uygun olmayan koşullarında ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de) ve uzun süreli (24 saat) muhafazada enterotoksin oluşumu için uygun bir ortam oluşturmaktadır.

Bu bağlamda çiğ köfte *B.cereus* ve enterotoksini açısından halk sağlığı için potansiyel risk oluşturmaktadır.

ÖZET

Enterotoksijenik *Bacillus cereus*'un Çiğ Köftede Enterotoksin Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi

Geleneksel bir ürün olan çiğ köftelerde; *B. cereus* varlığı ve 4-25 °C' lerdeki muhafaza koşullarında gelişme ve enterotoksin oluşturma yeteneklerinin farklı sıcaklık dereceleri ve sürelerde belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışma iki aşamada gerçekleştirildi.

Çalışmanın ilk aşamasında Ankara' da market, restoran ve açıkta satılan toplam 50 örneğin *B. cereus* varlığının saptanması ISO 7912 nolu standarda göre yapılırken, enterotoksin oluşturma yeteneği BCET-RPLA test kiti ile yapıldı. Buna göre toplam 50 örnekte % 44 (22/50) oranında *B. cereus* izole edildi. Pozitif örneklerin ortalama 2.55 log₁₀ kob/g düzeyinde *B. cereus* ile kontamine olduğu saptandı. BCET-RPLA test kiti ile yapılan enterotoksin tayininde % 60.36 (14/22) oranında *B. cereus* pozitif suşların enterotoksin oluşturduğu belirlendi.

İkinci aşamada ise deneysel olarak; geleneksel yöntemle hazırlanan çiğ köfte, *B. cereus* içermeyen kontrol grubu, enterotoksijenik *B. cereus* NCTC 11145 referans suşu ile 10² kob/g (A grubu), 10⁴ kob/g (B grubu) ve 10⁶ kob/g (C grubu) düzeylerinde kontamine edilerek 4 ve 25 °C' lerde muhafazada 0., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde analizleri yapıldı ve bu koşullar altında enterotoksin üretme yeteneği belirlendi. Buna göre çalışmada A, B ve C gruplarında sırasıyla, 0. saatte 2.20, 4.13, 6.00 log₁₀ kob/g düzeyleri 4 °C' de 24. Saatte 2.20, 3.20 ve 5.52 log₁₀ kob/g; 25 °C' de 24. Saatte 2.00, 3.62 ve 5.45 olarak belirlendi. Bu analizler sonucunda *B. cereus*' un gelişimi yönünden süreler ve muhafaza sıcaklıkları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsiz bulundu. BCET-RPLA test kitiyle yapılan enterotoksin tayininde her üç grupta 4 °C muhafazada 24 saat boyunca toksin oluşumu saptanmazken; 25 °C muhafazada sadece C grubunda 8., 12. ve 24. saatlerde toksin oluşumu belirlendi.

Sonuç olarak geleneksel bir ürün olan çiğ köftenin gerek ham maddelerinin yeterli hijyenik kaliteye sahip olmaması, gereksede yapım koşullarında yeterli hijyenik önlemlerin alınmaması, çiğ köftenin uygun muhafaza koşullarında bekletilmemesi ve çiğ olarak tüketilmesi nedeniyle *B. cereus*' un gelişebileceği ve enterotoksin oluşturarak halk sağlığı açısından potansiyel sağlık riski oluşturabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma geleneksel bir ürün olan çiğ köftelerin *B. cereus* varlığı ile farklı muhafaza dereceleri ve sürelerde enterotoksin oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi ve ileride çiğ köfte standartlarına temel oluşturması amacıyla yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus cereus*, Çiğ köfte, Enterotoxin üretimi

SUMMARY

The Detection Of The Ability To Growth And Enterotoxin Production of *Bacillus cereus* in Raw Meatball

This study was undertaken to determine the *B. cereus* existence, growth at 4-25°C storage conditions and enterotoxin forming ability at different temperatures and time range in raw meat ball, as a traditional product achieved in two stages.

In the first stage of the study, *B. cereus* existence was done according to ISO 7912 standart while enterotoxin forming ability was examined with BCET-RPLA test in total of 50 samples, sold at markets, restaurants and openly in Ankara. *B. cereus* was isolated at the rate of 44 % (22/50) in a total of 50 samples. It was determined the positive samples were contaminated with *B. cereus* positive strains were forming enterotoxin at the rate of 60.36 % (14/22) with BCET-RPLA test.

In the second stage as an experimental study, *B. cereus* free control group of raw meat-ball, prepared according to traditional method, was contaminated with enterotoxigenic *B. cereus* NCTC 11145 referans strain at the level of 10^2 cfu/g (Group A), 10^4 cfu/g (Group B) and 10^6 cfu/g (Group C) and analysed at 0.,2.,4.,6.,8.,12. and 24. hours of storage at 4-25°C, and also determined the enterotoxin forming ability under same conditions. The levels were observed as follows; 2.20, 4.13, 6.00 \log_{10} cfu/g in 0. hr; 2.20, 3.20 and 5.52 \log_{10} cfu/g at +4°C in 24. hr ; 2.00, 3.62, 5.45 \log_{10} cfu/g at 25°C 24. hr in A, B and C groups respectively. As a result of that analysis the difference between the time and storage temperatures was shown no importance statistically as regards the growth of *B. cereus*. While it couldn't be determined the toxin production through 24 hr at +4°C storage each three group with BCET-RPLA test, only on grup C enterotoxin production ability was determined at 25°C at 8., 12. And 24. hr.

As a conclusion it was suggested that, traditional product of raw meat-ball will be arised as a potential public health risk due to the inadequate hygienic conditions and the in appropriate hygienic precautions in producing stages, the storage conditions that are in appropriate, and the raw consuming of the product causes development of *B. cereus* and enterotoxin production.

This study was undertaken to determine the existence of *B. cereus* and the ability of enterotoxin producement and created basis to raw meat-ball standarts in future of raw meat-ball as an tradional meat product.

Key words: *B. cereus*, Raw meat-ball, Enterotoxin production.

5. KAYNAKLAR

AGATHA, N., OHTA, M., ARAKAWA, Y., MORI, M. (1994). A novel dodecathepsipeptide cerolide, isolated from *B. cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 31-34.

AĞAOĞLU, S., SANCAK, C.Y., ALIŞARLI, M., EKİCİ, K. (1999a). Van piyasasında satışı sunulan bazı baharat çeşidinde *B. cereus*'un varlığı ve önemi. *U.Ü. Vet. Fak. Derg.* (Baskıda)

AĞAOĞLU, S., EKİCİ, K., ALEMDAR, S. (1999b). Van'da tüketime sunulan bazı gıda maddelerinde *B. cereus*'un varlığı *Y.Y.Ü. Ziraat Fak. Tarım Bil. Derg.* **9**: 1-4

AĞAOĞLU, S., EKİCİ, K., ALEMDAR, S., GÜDÜCÜOĞLU, H. (1999c). Çiğ süt ve bazı süt ürünlerinde *B. cereus*'un varlığının araştırılması *Y.Y.Ü. Ziraat Fak. Tarım Bil. Derg.* **9**: 5-7

AKSU, H., ERGÜN, Ö. (1994a). Konserve ve dondurulmuş gıdalarda *Bacillus cereus*' un varlığı. *Veterinarium*, **5** (1-2): 20-22

AKSU, H., ERGÜN, Ö. (1994b). Hazır çorbalarda *Bacillus cereus*' un varlığı. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **25** (1-2): 77-82

AKSU, H., ERGÜN, Ö. (1995). Hazır yemeklerde *Bacillus cereus*' un varlığı. *Gıda Sanayii Derg.*, **40**: 29-32

AKSU, H., ERGÜN, Ö. (1996). Çeşitli hazır pasta ürünlerinde ve sütlü tatlılarda *Bacillus cereus*'un varlığı. *Türk Veteriner Derg.*, **55**-57

ANONİM (2000). Türk Standardı. TS 6404 EN ISO 7932.

ANTAL, S.P. (1988). Study of the *Bacillus* flora of Nigerian spices. *Int. J Food Microbiol.* **6**(3): 259-261

ARSLAN, A., GÜVEN, A., SALTAN, S., PATIR, B. (1992). Elazığ'da tüketime sunulan çiğ köftelerin mikrobiyolojik kalitesi. *F.Ü. Sağlık Bil. Derg.* **6**(1,2): 13-18

- BACHHIL, V.N., JAISWAL, T.N. (1988). *Bacillus cereus* in meat: prevalence and enterotoxigenicity. *J. Food Sci. Technol.*, **25** (6): 371-372.
- BAUMGART, J. (1993). Microbiologische Untersuchung von Lebensmitteln. pp.69-75.
- BECHER, H., SCHALLER, G., WIESSE, W., TERPLAN, G. (1994). *B.cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 1-15.
- BECKER, M., EL-BASSIONY, T.A., TERPLAN, G. (1984). Incidence of *B.cereus* and other pathogenic microorganisms in infant foods. *Zentr. Bacteriol. Hyg. Abt.1*, **179**:198-206.
- BENNETT, W.R. (1995). *Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin. In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 1998., 8th Ed. Chapter 15.
- BEECHER, D.J., BARNEY, N.P., WONG, A.C.L. (1995). Extracellular virulence factors in *B. cereus* endophthalmitis: Methods and implication of involvement haemolysin BL. *Infect. Immun.* **63**: 632-639.
- BEECHER, D.J., WONG, A.C. (1994). Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *B. cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(12): 4614-4616.
- BEUCHAT, L.R., CLAVERON, M.R., JAQUETTE, C.B. (1997). Effect of nisin and temperature on survival, growth, and enterotoxin production of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef grawy. *Appl. Environ Microbiol.* **63**(5): 1953-1958
- BHAT, R., GEETA, H., KULKARNI, P.R. (1987). Microbial profile of cumin seeds and chili powder sold in retail shops in the city of Bombay. *J. Food Prot.* **50** (5): 418-419.
- BİLGEHAN, H. (1992). Klinik Mikrobiyoloji. Barış matbaası. İzmir s.331-332.
- BLAKEY, L. J., PRIEST, F.G. (1980). The occurrence of *Bacillus cereus* in some dried foods including pulses and cereals. *J. Appl. Bact.* **48**: 297-302
- BOSTAN, K., AKSU, H. (1995). Beyaz peynirlerde *Bacillus cereus* 'un mevcudiyeti ve yaşama süresi üzerine bir çalışma. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* **25**: 84-88

- BRETT, M.M. (1998). Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfall and benefits., *J.Appl. Microbiol.Symp.Supp.*, 84: 11S-118S; In: Anon.(1999) Mikrobiyolojik Analiz Yöntemlerinde Yeni Yaklaşımlar. Hemakim Tıbbi Ürünler Tic.Ltd. Şti.İstanbul.
- BRIDSON, E.Y. (1988). ' The Oxoid Manual '8th Edition. Oxoid Ltd., Hamshire.
- BRYAN, L.F. (1988). Risc associated with vechicles of food-borne pathogens and toxins. *J. Food Prot.* 51(6): 498-508.
- BUCHANAN, M., GIBBONS, M. (1984). *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology.* 9th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- CHRISTIANSON,A., SATYANARAYAN, N., NILSON, I., WADSTROM, T., PETTERSON, H.E. (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Appl. Environ. Mic.* 55 (10): 2595-2600.
- CHUNG, K.T., SUN, H.L.(1986). Distribution and characteristics of *B. cereus* isolated from rice in Taiwan. *J. Food Sci.*51 (5): 1208-1212
- COLLINS, C.H., LYNE, P.M. (1985). *Microbiological Methods* (5th Edition) Butterworths
- COOK, P.E., THEMBA, M.M., CAMPBELL-PLATT, G. (1991). Growth of *Bacillus cereus* during rice tape fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 78-81.
- DEAMBROSIS, N., DA SILVA, A. (1992). Incidence of *Bacillus cereus* in spices. 3rd World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Berlin Vol 1: 315-316.
- DOĞANAY, M., BAKICI, M.Z. (1985). Food Poisoning caused by *Bacillus cereus*. *Mikrobiyol. Bult.* PMID. 3938520.
- DOYLE, M.P. (1988), *Bacillus cereus.* *Food Technol.* 4: 198
- DUFRENNE, J., BIJWARD, M., te GIFFEL, M., BEUMER, R., NOTERMANS, S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 27(2) :175-183.

- DROBNIIEWSKI, F.A. (1993). *B. cereus* and related species. *Clin. Microbiol.* 6(4): 324-338.
- EKEMEN, R. (2002). Ankara Garnizonundaki Birliklerde Tüketilen Sıtlı Tatlıların Mikrobiyolojik Kalitesi. Ank. Üniv. Sağlık Bilim. Enst. Yüksek Lisans Tezi.
- EROL, İ., MUTLUER, B., VATANSEVER, L. (1993), A tipi enterotoksin oluşturan *Staphylococcus aureus* 'un çiğ köftede üreme ve toksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesi. *Gıda*, 18 (5): 315-318
- EROL, İ. (1999). Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğrenci Tezleri. s.: 74-76
- EROL, İ., KÜPLÜLÜ, Ö., KARAGÖZ, S. (1999). Ankara'da tüketime sunulan bazı baharatın mikrobiyolojik kalitesi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 46: 115-125.
- GARCIA, S., IRACHETA, F., GALVAN, F., HEREDIA, N. (2001). Microbiological survey of retail herbs and spices from Mexican markets. *J. Food Prot.* 64 (1): 99-103.
- GIANELLA, R.A., BRASILE, L. (1979). A hospital food-borne outbreak of diarrhea caused by *Bacillus cereus*: clinical, epidemiologic and microbiologic studies. *J. Infect. Dis.* 139(3): 366-370.
- GILBERT, R.J. (1988). Food - borne infections and intoxications - recent problems and new organisms. *Br. Food J.*, 90 (2): 71-73.
- GOEPFERT, J.M., SPIRA, W.A., KIM, H.U. (1972). *Bacillus cereus*: food poisoning organism . A review. *J. Food Technol.* 35: 213-227
- GÖKTAN, D., TUNCEL, G. (1988). Effect of ingredients on quantitative recovery of *Salmonella* in raw meatballs. *Meat Science* 22: 155-160.
- GRANUM, P.E. (1994). *B. cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 615-665.
- GRANUM, P.E., LUND, T. (1997). *Bacillus cereus* and its poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett.* 157 (2): 223-228
- GRANUM, P.E., O'SULLIVAN, K., LUND, T. (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *B. cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177 (2): 225-229.

GREENWOOD, M.H., COETZEE, E.F., FORD, B.M., GILL, P., HOOPER, W.L., MATTHEWS, S.C.V., PATRIC, S.(1984). The microbiology of selected retail food products with an evaluation of viable counting methods. *J. Hyg. Comb.* 92: 62-67.

GRIFFITHS, M.W. (1990). Toxin production by psychrotropic *Bacillus cereus* spp. Present in Milk. *J.Food Prot.* 53(9): 790-792.

HANSEN, B.M., HENDRIKSEN, N.B. (2001). Detection of enterotoxic *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1): 185-189.

HARMON, S.M., KAUTTER, A.D., SOLOMON, H.M. (1987). *B. cereus* contamination of seeds and vegetable sprouts grown in a home sprouting kit. *J.Food Prot.* 52: 62-65.

HARMON, S.M., KAUTTER, A.D. (1991). Incidence and growth potential of *B.cereus* in ready to serve foods. *J.Food.Prot.* 54 (5):372-374.

HARRIGON, W.F. (1998). Laboratory Methods in Food Microbiology, Academic Press, San Diego; In:Anon.(1999) Mikrobiyolojik Analiz Yöntemlerinde Yeni Yaklaşımlar. Hemakim Tıbbi Ürünler Tic.Ltd. Şti.İstanbul.

HEFNAVY, Y., ABDEL-RAHMAN, H., LOTFI, A. (1984). Occurrence of *B. cereus* in selected meat products. *Fleischwirtsch.* 64(11): 1371-1372.

HITCHINS, A.B., HARTMAN, P.A., TODD, E.C.D. (1992). Coliforms Escheria coli and its toxins. In: Compendium of the Methods for the Microbiological Examinations of Foods. Ed. C. Vanderzant, D.F., Splittstoesser, American Public Health pp. 325-367.

İNAL, T. (1969). İzmir bölgesinde *B. cereus*'un sebep olduğu bir zehirlenme vak'ası. Bornova Vet. Araş. Enst. Derg., 10 (19) : 1-4.

İNAL, T. (1990). Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi. Final Ofset, İstanbul.

JACKSON, S.G., GOODBRAND, R.B., AHMED, R., KASATIYA, S. (1995). *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21(2): 103-105. Abst.

JAQUETTE, C.B., BEUCHAT, L.R. (1998). Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. *J. Food Prot.* 61(12): 1629 -1635

JAY, J.M. (1992). *Modern Food Microbiology*. 4th.Ed. NewYork. pp.: 501-503

JOHNSON, K.M. , NELSON, C.L. , BUSTA, F.F (1982). Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* Spores from strains associated with diarrheal and emetic Food-borne illnesses. *J.Food Sci.* 47: 1268-1271.

JOHNSON, K.M. , NELSON, C.L. , BUSTA, F.F (1983). Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. *J. Food Sci.* , 48(1): 286-287

KAMAT, A.S., NERKAR, D.P., NAIR, P.M. (1989). *Bacillus cereus* in some Indian foods, incidence and antibiotic, heat and radiation resistance . *J. Food Safety*, 10: 31-41

KAYMAZ, Ş. (1997). Ankara'da tüketime sunulan Hamburgerlerde halk sağlığı yönünden önemli bazı bakterilerin saptanması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 34 (3): 577-593.

KONUMA, H., SHINGAWA, K., TOKUMARU, M., ONOUE, Y., KONNO, S., FUJINO,N., SHIGEHISA, T., KURATA, H., KUWABARA, Y.,LOPES, C.A.M. (1988). Occurence of *Bacillus cereus* in meat product, raw meat and meat product additives . *J. Food Prot.*, 51(4): 324-326.

KRAMER, J.M., GIBBERT, R.J. (1989). *Bacillus cereus* and *Bacillus* species. In. *Food Borne Bacteriol Pathogens Inc.* NewYork. pp. 21-70.

KÜPLÜLÜ, Ö., SARIMEHMETOĞLU, B., ORAL, N. (2000). Ankara' da tüketime sunulan çiğ köftelerin mikrobiyolojik kalitesi. *Gıda Derg.* (Basımda)

LANCETTE, G.A., TATINI, S.R. (1992). *Staphylococcus aureus*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. Ed. C. Vanderzant. D.F. Splitthoesser, D:C: pp.623-633.

LUND, B.M. (1991). Food Borne Disease Due to *Bacillus* and *Clostridium* Species. Food – borne illness. *Lancet Rew.* In. Edward Arnold, London, Melbourne. Ed. Waites, W:M: and Arbuthnott, J:P.

- LUND, T., GRANUM, P.E. (1996). Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *B. cereus* isolated after a food-borne outbreak. *FEMS Microbiol.* 141: 151-156.
- LUND, T., GRANUM, P.E. (1997). Comparison of biological effects of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *B. cereus*. *Microbiology.* 143: 3329-3336.
- MAHAKARNCHANAKUL, W., BEUCHAT, L.R. (1999). Influence of temperature shifts on survival, growth and toxin production by psychrotrophic and mesophilic strains of *B. cereus* in potatoes and chicken gravy. *Int. J. Food Microbiol.* 47(3): 179-187.
- MISLIVEC, P.B., BEUCHAT, L.R., COUSIN, M.A. (1992). Yeast and Molds In: Compendium of the Methods for the Microbiological Examinations of Foods. Ed. C. Vanderzant, D.F., Splittstoesser, American Public Health pp. 239-245.
- MOL, J.H. (1957). The temperature characteristics of spor germination and growth. *J.Bact.* 20(3):454. In: Jay, J.M.(1992) *Modern Food Microbiology*.
- NOTERMANS, S., BATT, C.A. (1998). A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins., *J. Appl. Microbiol. Symp. Supp.*, 84:515-615; In: Anon.(1999) *Mikrobiyolojik Analiz Yöntemlerinde Yeni Yaklaşımlar*. Hemakim Tıbbi Ürünler Tic.Ltd. Şti. İstanbul.
- ÖZALP, E., KAYMAZ, Ş. (1995). *Süt Ürünleri Teknolojisi*. Ank. Üniv. Vet.Fak. Öğrenci teksiri.
- PENDUKAR, S.H., KULKARNI, P.R. (1988). Chemical Composition of *Bacillus* spores. *Die Nahrung*, 32 (10): 1003-1004.
- PENDUKAR, S.H., KULKARNI, P.R. (1989). Heat resistance of *Bacillus* spores exposed to food processing conditions. *Die Nahrung*, 34:177-180
- PAFUMI, J. (1986) Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. *J. Food Prot.* 49 (12) : 958-963
- PRUSS, B.M., DIETRICH, R., NIBBER, B., MARTLBAUER, E., SCHERER. (1999). The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *B. cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (12): 5436-5442.
- RAEVUORI, M., GENIGEORGIS, C. (1975). Effect of pH and sodium chloride on growth of *B. cereus* in laboratory media and certain foods. *App. Microbiol.*, 29 (1): 68-73.

- ROBERTS, D., GILBERT, R.J., NICHOLSON, R., CHRISTOPHER, P., ROE, S., DAILLEY, R. (1989). The Microbiology of Airline Meals. *Environ. Hlth.* 97(3): 56-62.
- RODRIGEZ, M. H., BARRETT, E. L. (1986). Changes in microbial population and growth of *Bacillus cereus* during storage of reconstituted dry milk. *J. Food Prot.* 49 (9): 680-686
- ROSENBERGER, A., WEBER, H. (1993). Keimbelastung von Gewürzproben. *Fleischwirtsch.* 73(8) : 830-833
- SHARMA, A., PADWAL-DESAI, S.R., NAIR, P.M. (1989). Assessment of microbiological quality of some irradiated Indian spices. *J. Food Sci.* 54(2): 489-490.
- SHIGEHISA, T., LOPEZ, C. (1988). Enumeration of aerobic spore-formers and *Bacillus cereus* in meat product additives. *J. Food Prot.* 51(8): 648-650.
- SHINAGAWA, K., MATSUSAKA, N., KONUMA, H., KURATA, H. (1985). The relation between the diarrheal and other biological activities of *Bacillus cereus* involved in food poisoning outbreaks. *Jpn. J. Vet. Sci.* 47(4): 557-565.
- SHINAGAWA, K. (1990). Analytical methods for *B. cereus* and other *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* 10(2): 125-141.
- SINGH, D.K., NARAYAN, K.G., GUPTA, M.K. (1992). Mechanisms of *B. cereus* enteropathy. *Indian J. Exp. Biol.* 30 (4): 324-326
- SINEV, M.A., BUDARINA, I., GAVRILENKO, I.V. (1993). Evidence for existence of *B. cereus* hemolysin II: cloning of hemolysin II. genetic determinant. *Molec. Biol.* 27: 753-760
- SNEATH, P.H.A. (1988). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Vol .2, Williams and Wilkins 428. East Preston Street Baltimore MD, 21 222, USA.
- STEINHARD, E.C., COCHRANE, A.B., DOYLE, E.M. (1996). Food Safety. Food Research Institute Madison, Wisconsin pp. 401- 414
- SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU, V. (1994). *Biyoistatistik*. Özdemir Yayınları, Ankara.

- SWANSON, K.M.J., BUSTA, F.F., PETERSON, E.H., JOHNSON, M. G. (1992). Colony count methods. In.: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 3rd ed. Ed. Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F., American Public Health Association. Washington, D. C.
- SZABO, R.A., SPEIRS, J.I, AKHTAR, M. (1991). Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stabile toxin. *J. Food Prot.*, **54** (4): 272-276
- TAN, A., HEATON, S., FARR, L., BATES, J. (1997). The use of *Bacillus* diarrhoeal enterotoxin (BDE) detection using an ELISA technique in the confirmation of the aetiology of *Bacillus*-mediated diarrhoea. *J. Appl. Microbiol.* **82**(6): 677-682.
- TERNSTRÖM, A., MOLIN, G. (1987). Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Food Prot.* **50** (2) : 141-146
- TRYFINOPOULOU, P., DROSINOS, E. H., NYCHAS, G.J.E. (2001). Performance of *Pseudomonas* CFC-selective medium in the fish storage ecosystems. *J. Microbiol. Methods*, **47**: 243-247
- TŐRECI, K. (1983). Bacterial food poisoning pp.15-34, Regional Training Course on " Microbial Culture Maintenance and Detection with Special Reference to Food Microbiology" August-21/sept.-7, İst. Ü. Yıp Fak. Yay. No: 158
- TURNBUL, P.C., KRAMER, J.M., JORGENSEN, K., GILBERT, R.J., MELLING, J. (1979). Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal and necrotizing toxins of *B. cereus*. *Am. J. Clin. Nutr.* **139** (3): 366-370.
- VAN NETTEN, P. VAN DE MOOSDISK, A., VAN HOENSEL, P. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**:73-79
- VILLAGARCIA, N. (1985). The scope and limitation of four methods for the rapid identification of Enterobacteriaceae in foods. *J. Food Microbiol.*, **20**: 259-267.
- WYATT, J., GUY, V. (1980). Growth and isolation of *B. cereus* in retail pumpkin pies. *J. Food Sci.* **51**(9): 707-710.
- WONG, H.C., CHANG, N.H., FAN, J.Y. (1988). Incidence and characterisation of *B. cereus* isolates contaminating dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:699-702.

ÖZGEÇMİŞ

Manisa' da 1972 yılında doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Manisa'da tamamladım. 1991 yılında girdiğim Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi' nden 1996 yılında mezun oldum. 1996-1997 öğretim yılı ikinci yarısında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı' nda doktora öğrenimime başladım. 1999 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı' na Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen aynı görevi sürdürmekteyim.