

## Malatya İlinde Üretilen Peynirlerden İzole Edilen *Bacillus cereus* Suşlarında Enterotoksin Kodlayan Genler ile Antibiyotik Direncinin Araştırılması

Hayriye Yeşim CAN<sup>1\*</sup>, Kardelen Banu SARI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, 31060, Hatay

<sup>2</sup> Seher Entegre Tavukçuluk, 44210, Malatya

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5191-6268>

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1621-5105>

\*Sorumlu yazar: [yesimcan@mku.edu.tr](mailto:yesimcan@mku.edu.tr)

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihçesi:

Geliş tarihi: 03.11.2022

Kabul tarihi: 19.02.2023

Online Yayınlanma: 05.07.2023

#### Anahtar Kelimeler:

*Bacillus cereus*

Peynir

Antibiyotik

Enterotoksin

Gen

### ÖZ

Bu çalışmada, Malatya ilinde üretilen ve halk tarafından yaygın olarak tüketilen yöresel köy tipi peynir örneklerinde, i) *Bacillus cereus*'un varlığının belirlenmesi, ii) izolatlarda enterotoksin genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması ve iii) antibiyotik direncinin belirlenmesi amaçlandı. Analize alınan toplam 75 adet peynir örneğinin 55'inde (%73,3) *B. cereus* saptandı. Yapılan moleküler analizler sonucunda, toplam 55 adet izolat *B. cereus* yönünden hemolizin geni hedef alınarak doğrulandı. Bu izolatlardan 3'ünün sadece *nhe* genini, 1'inin ise hem *nhe* hem de *cytK* genlerini taşıdığı tespit edildi. Ancak izolatların hiçbirisinde *hbl* genine rastlanılmadı. Antibiyotik duyarlılık testi sonucunda, izolatların tamamı (%100) sefoksitine karşı dirençli olarak bulundu. Ayrıca, %94,5 ile rifampin, %87,2 ile penisilin, %58,1 ile eritromisin, %56,3 ile gentamisin ve %12,7 ile kloramfenikol dirençliliği tespit edildi. İzolatların %94,5'inin çoklu antibiyotik direnci gösterdiği belirlendi. Gıda güvenliği ve halk sağlığı kapsamında değerlendirildiğinde, çalışmadan elde edilen bulgular, sağlıklı peynir üretimi için gerekli teknolojik ve hijyenik önlemlerin alınması yönünde hem süt endüstrisine hem de halka önemli bilgiler sunmaktadır. Ayrıca, izolatların yüksek düzeyde çoklu antibiyotik direnci göstermesi, bu konuda alınacak önlemlere bağlı olarak halk sağlığının korunmasına katkı sağlayacaktır.

## Investigation of Enterotoxin-Encoding Genes and Antibiotic Resistance in *Bacillus cereus* Strains Isolated from Cheese Produced in Malatya Province

### Research Article

#### Article History:

Received: 03.11.2022

Accepted: 19.02.2023

Published online: 05.07.2023

#### Keywords:

*Bacillus cereus*

Cheese

Antibiotic

Enterotoxin

Gene

### ABSTRACT

In this study, it was aimed, i) to determine the presence of *Bacillus cereus* in local village type cheese samples produced in Malatya and consumed widely by the people of Malatya, ii) detection of enterotoxin genes in the isolates by polymerase chain reaction (PCR), and iii) determination of antibiotic resistance. *B. cereus* was detected in 55 (73.3%) of 75 cheese samples in total. After molecular analysis, a total of 55 isolates were confirmed as *B. cereus* by targeting the hemolysin gene. It was determined that 3 of these isolates carried only the *nhe* gene, and 1 of them carried both *nhe* and *cytK* genes. However, no *hbl* gene was found in any of the isolates. As a result of the antibiotic susceptibility test, all of the isolates (100%) were resistant to cefoxitin. Also, resistance to rifampin with 94.5%, penicillin with 87.2%, erythromycin with 58.1%, gentamicin with 56.3%, and chloramphenicol with 12.7% were found. It was determined that 94.5% of the isolates showed multiple antibiotic resistance. Within the scope of food safety and public health, these findings can give important

information to the both dairy industry and public in order to take the necessary technological and hygienic measures for healthy cheese production. In addition, determination of very high level of multiple antibiotic resistance among the isolates will contribute to the protection of public health depending on the measures to be taken in this regard.

**To Cite:** Can HY., Sarı KB. Malatya İlinde Üretilen Peynirlerden İzole Edilen *Bacillus cereus* Suşlarında Enterotoksin Kodlayan Genler ile Antibiyotik Direncinin Araştırılması. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2023; 6(2): 1500-1512.

## 1. Giriş

*Bacillus cereus*, Gram pozitif, aerob ya da fakültatif anaerob, endospor oluşturma yeteneğine sahip bir bakteri olup, insanlarda emetik ve diyarel sendrom olmak üzere, iki tip gıda kaynaklı enfeksiyona neden olmaktadır (Liu ve ark., 2020). Etken patojenitesini farklı tipte ürettiği toksinler aracılığıyla göstermektedir. Bu amaçla, hemolizin BL (Hbl), non-hemolitik enterotoksin (nhe), sitotoksin K (cytK) ve enterotoksin FM (entFM) gibi diyarden sorumlu enterotoksinleri ve emetik toksini (cereulide) sentezler (Logan, 2012; Tewari ve Abdullah, 2015; Walker-York-Moore ve ark., 2017; Pei ve ark., 2018; Gdoura-Ben Amor ve ark., 2018). Enterotoksinlerden farklı olarak, emetik toksini ısıya ve aside dirençli bir peptid olup, kontamine gıdada sentezler. Emetik form, tipik bir gıda intoksikasyonu olup, kontamine gıda tüketiminden 1-5 saat sonra mide bulantısı ve kusma ile seyrederek. Diyarel form, bir Toksi-enfeksiyon olup, etken toksinlerini intestinal kanalda gelişirken sentezlemektedir. Kontamine gıda tüketiminden 8-16 saat sonra ortaya çıkan diyare ve abdominal ağrı gibi semptomlarla karakterizedir (McKillip, 2000; Wijnands ve ark., 2006; Gao ve ark., 2018; Adame-Gomez ve ark., 2020; Hammad ve ark., 2021). Her iki sendromda da semptomlar genellikle 24 saatten daha az sürmektedir. Bu nedenle, *B. cereus* kaynaklı gıda enfeksiyonları düşük düzeylerde rapor edilmektedir (Tewari ve Abdullah, 2015; Abraha ve ark. 2017; Gdoura-Ben Amor ve ark., 2018). Bununla birlikte, *B. cereus*, immun sistemi baskılanmış kişilerde fırsatçı bir patojen olarak, endoftalmit, endokardit, pnömoni, septisemi, gastrit, osteomyelit ve hepatit gibi ciddi seyirli ekstraintestinal enfeksiyon ve yangısal reaksiyonlara yol açabilir (McKillip, 2000; Gao ve ark., 2018; Pei ve ark., 2018; Hammad ve ark., 2021).

*B. cereus* aslında bir toprak saprofiti olup, doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Sporlu bir bakteri olması ve sporlarının ısıya direnç göstermesi, buzdolabı sıcaklığında gelişebilmesi ve toksin üretebilmesi nedeniyle gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturur (McKillip, 2000; Özdemir, 2003; Wijnands ve ark., 2006; Gündogan ve Avcı, 2014; Abraha ve ark., 2017; Gdoura-Ben Amor ve ark., 2018; Pretorius ve Buys, 2021). Üreme sıcaklığı aralığı oldukça geniş olup (4-50 °C), 45 °C'nin üzerinde ve 7 °C'nin altında üreyebilen termofilik ve psikrotrof suşlarının olduğu bilinmektedir (Tewari ve Abdullah, 2015).

Spor formu bakterinin olumsuz koşullara karşı daha dirençli olmasını sağlayarak, çevreye ve gıdalara bulaşmasında önem taşır (Kotiranta ve ark., 2000; Logan, 2012). *B. cereus*'un çiğ sütün doğal bir kontaminantı olduğu, düşük düzeylerde de olsa spor formunda çiğ sütte sıklıkla bulunabileceği ve yaz mevsimi boyunca sütteki düzeyinin arttığı belirtilmiştir (Becker ve ark., 1994; Larsen ve Jorgensen,

1997; Tewari ve Abdullah, 2015; Liu ve ark., 2020). Dolayısıyla, süt ve ürünlerini sıklıkla kontamine ederek, kalite kusurlarına yol açabilir (Ahmed ve ark., 1983; Wong ve ark., 1988; McKillip, 2000; Pei ve ark., 2018). Ayrıca, *B. cereus*'un süt hayvanlarında ciddi seyirli mastitise yol açtığı bilinmektedir (Schiefer ve ark., 1976; Becker ve ark., 1994). *B. cereus* süte toprak, hava, su, gübre, yem, hayvanın meme başından ve sağım yapanlardan geçebildiği gibi, ayrıca süt sağım ekipmanlarında da etkenin sporlarına rastlanılmaktadır. Süt sağım ekipmanlarında bulunabilen sporların yukarıda belirtilen diğer kaynaklardaki sporlara göre daha yavaş germine olabildiği ve yavaş germine olan sporların hızlı germinasyona sahip sporlara göre daha dirençli oldukları belirtilmiştir. Sporları hidrofobik özellikte olup, temizlik ve dezenfeksiyon işlemi yetersiz uygulandığında alet ve ekipman yüzeylerine tutunarak biyofilm tabakası oluşturmaktadır. Bunun sonucunda kontaminasyon riski artmaktadır (Becker ve ark., 1994; Larsen ve Jorgensen, 1997; Kotiranta ve ark. 2000; Özdemir, 2003; Magnusson ve ark., 2007; Logan, 2012; Gdoura-Ben Amor ve ark., 2018; Pretorius ve Buys, 2021). Etkenin sporlarının pastörizasyondan sonra da canlılığını sürdürebileceği belirtilmiştir. Hızlı germine olabilen sporları 72 °C'de 10 sn süre ile pastörizasyon işleminden sonra, sütte 20 °C'de 24 saat içerisinde germine olabilirler (Becker ve ark., 1994; Stenfors Arnesen ve ark., 2008; Logan, 2012; Pei ve ark., 2018; Liu ve ark., 2020). Bu durum, pastörize süt üretiminde teknolojik kusurlara, raf ömrünün kısılmasına, ekonomik kayıplara ve gıda güvenliği problemlerine yol açabilir (Ahmed ve ark., 1983; Kotiranta ve ark., 2000; Magnusson ve ark., 2007; Logan, 2012; Gao ve ark., 2018). Öte yandan, bazı *B. cereus* suşları insanlarda probiyotik amaçlı da kullanılabilen ve spor formunda probiyotik ürünlerde uzun süre canlılığını korumakta ve mide asit bariyerini de kolaylıkla aşabilmektedir. Bu tür probiyotik ürünler, başta Vietnam olmak üzere Güneydoğu Asya'da yaygın olarak pazarlanmakta, yine son dönemde batıda da bu konuya ilgi hızla artmaktadır (Logan, 2012; Liu ve ark., 2020).

*B. cereus* rekabetçi yeteneği zayıf bir bakteri olmasına rağmen, gıdalara uygulanan ısı işlemi yarışmacı floranın baskılanmasına, *B. cereus*'un florada baskın hale gelmesine ve oda sıcaklığında muhafaza sırasında sporların germinasyonuna neden olabilmektedir (Mc Killip, 2000; Gdoura-Ben Amor ve ark., 2018).

*B. cereus* pastörize süt ve ürünlerinin raf ömrünü belirlemede etkin rol oynamaktadır (Becker ve ark., 1994; Magnusson ve ark., 2007). Özellikle psikrotrofik suşları soğukta muhafaza sırasında (7 °C'nin altında) gelişerek, birtakım ekstrasellüler enzimler (proteaz gibi) salgılayarak süt ve ürünlerinde bozulmaya yol açabilir (Te Giffel ve ark. 1997, McKillip, 2000, Tewari ve Abdullah, 2015, Abraha ve ark. 2017, Pretorius ve Buys, 2021). Sporları UHT (utrahigh heat treatment) süt üretiminde yıkımlanabilmekte, ancak lipolitik ve proteolitik enzimleri tamamen inhibe edilememektedir. Dolayısıyla, oda sıcaklığında aktive olan bu enzimler uzun ömürlü sütlerde arzu edilmeyen tat, aroma ve yapı oluşumuna neden olabilir (Becker ve ark., 1994; Larsen ve Jorgensen, 1997; Özdemir, 2003; Logan, 2012).

Antibiyotik direnci patojen bakterilerde ortaya çıkan önemli bir halk sağlığı ve gıda güvenliği sorunu olup halen güncelliğini korumaktadır. Antibiyotiklerin tedavi amaçlı hayvansal üretimde ve beşeri

hekimlikte aşırı ve bilinçsizce kullanımını sonucunda ortaya çıktığı bildirilmektedir. Genellikle hayvansal gıdaların tüketimiyle dirençli suşların insanlara geçtiği bilinmektedir. Plazmid kökenli aktif antibiyotik direnç mekanizmasına sahip olan patojen bir bakteri, bunu floradaki diğer patojen bakterilere de aktarabilir. Bununla birlikte, gıda kaynaklı patojen bakterilerde çoklu antibiyotik direncinin tespit edilmesi ise endişe vericidir. Bu durumda, dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olan antibiyotiğin klinik etkinliği azalarak, günümüzde tedavisi zorlaşan antibiyotiklere dirençli infeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (WHO, 2020; WHO, 2021). *B. cereus*'un üç farklı tipte beta-laktamaz enzimini sentezleyebilmesi virülensi açısından önemli olup, buna bağlı olarak üçüncü kuşak sefalosporinler de dahil olmak üzere, genellikle beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç göstermektedir (Kotiranta ve ark., 2000).

*B. cereus*'un çiğ sütün doğal bir kontaminantı olduğunu dikkate aldığımızda, kontamine sütün peynir üretiminde kullanılması sonucunda etken son ürüne geçebilir. Ayrıca, peyniri tüketime hazır bir gıda olarak değerlendirdiğimizde, enterotoksijenik ve antibiyotiklere dirençli *B. cereus* suşları halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturabilir. Bu amaçla, bu çalışmada Malatya ilinde üretilen ve halk tarafından da yaygın olarak tüketilen yöresel köy peyniri örneklerinde *B. cereus* varlığı tespit edilerek, elde edilen izolatlarda enterotoksin genlerinin varlığı ile izolatların bazı antibiyotiklere karşı dirençliliği araştırıldı.

## 2. Materyal ve Metot

Çalışma kapsamında, Malatya ilinde peynir pazarı ile şarküterilerde yaygın olarak satılan ve evlerde de geleneksel yöntemlerle üretilen ve halk tarafından 'Malatya peyniri' olarak adlandırılan yöresel köy peyniri örnekleri toplanarak, materyal olarak kullanıldı. Bu amaçla, her biri yaklaşık 150-200 g olan toplam 75 adet peynir örneği, aseptik koşullarda toplanarak, soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı ve aynı gün analize alındı.

### 2.1. *B. cereus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

Bu amaçla, öncelikle peynir örneklerinde klasik kültür tekniği ile *B. cereus* izolasyonu (Tallent ve ark., 2012) gerçekleştirildi. Elde edilen izolatlar hemolizin geni hedef alınarak PCR yöntemi ile doğrulandı (Wang ve ark., 1997). Ön zenginleştirme için, her bir peynir örneğinden aseptik koşullarda homojen olarak steril polietilen poşetlere 10'ar g tartıldı. Örneklerin üzerine polimiksin B içeren Tryptic Soy Broth'dan 90 ml eklendi. Hazırlanan örnekler stomacher'de (Interscience, France) 2 dk süre ile homojenize edildi ve daha sonra, 30 °C'de aerob koşullarda 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda Brilliance *Bacillus cereus* agara çizme plak yöntemi ile ekimler yapıldı. Plaklar 30 °C'de aerob koşullarda 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda, agarda üreyen turkuaz yeşili renkteki koloniler *B. cereus* şüpheli olarak değerlendirildi.

## 2.2. Pozitif kontrol

Çalışmada pozitif kontrol olarak, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu Laboratuvarından temin edilen *B. cereus* suşu kullanıldı.

## 2.3. Moleküler Analizler

Şüpheli kolonilerden kaynatma yöntemi kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı (Adame-Gómez ve ark., 2020). Steril ependorf tüplerine 100'er mikrolitre Dnaz/Rnaz içermeyen saf su konuldu. Öze yardımıyla alınan şüpheli koloniler, ependorf tüplerine aktarıldı ve tüpler vortekslendi. Sıcak su banyosunda 95 °C'de 10 dakika kadar bekletildi. Sıcak su banyosundan çıkarılan tüpler, kuru buz üzerine alınarak, 4 °C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra 10.000x g'de 10 dk santrifüj edildi. Tüpün dibindeki tortu kısmına değmeden, süpernatant kısmından 60-80 µl kadar pipetle alınarak, steril ependorf tüplerine aktarıldı. Elde edilen DNA'lar, ileri analizler için -20 °C'de stoklandı.

Elde edilen DNA'lar, Wang ve ark. (1997) tarafından önerilen amplifikasyon koşulları ve primer çiftleri kullanılarak hemolizin geni hedef alınarak *B. cereus* yönünden PCR ile doğrulandı (Tablo 1). PCR miksi, DreamTaq Green PCR master miks (2X)'den 12,5 µl, 10 pmol/µl konsantrasyonda hazırlanan her bir primerden 0,625 µl, saf sudan 9,25 µl ve hedef DNA'dan 2 µl ilave edilerek, total hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra, hazırlanan örnekler Thermal Cycler'da (Boeco TC Pro, Germany) amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon koşulları, 94 °C'de 15 sn ön denatürasyon, 35 siklus şeklinde tekrarlayan 94 °C'de 3 sn denatürasyon, 50 °C'de 10 sn primer bağlanması, 74 °C'de 35 sn primer uzaması ile son olarak, 74 °C'de 2 dk ilave uzama aşamalarını içerecek şekilde uygulandı.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve amplikon büyüklükleri

Hedef gen	Primer sekansı (5'- 3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	Referans
Hemolizin geni	BC-1, CTGTAGCGAATCGTACGTATC BC-2, TACTGCTCCAGCCACATTAC	185	Wang ve ark. (1997)
<i>hbl</i>	HD2 F, GTA AAT TAI GAT GAI CAA TTTC HA4 R, AGA ATA GGC ATT CAT AGA TT	1091	
<i>nhe</i>	NA2 F, AAG CIG CTC TTC GIA TTC NB1 R, ITI GTT GAA ATA AGC TGT GG	766	Ehling-Schulz ve ark.(2006)
<i>cytK</i>	CK F2, ACA GAT ATC GGI CAA AAT GC CK R5, CAA GTI ACT TGA CCI GTT GC	421	

Doğrulanmış izolatlarda diyarel toksin genlerinin (*nhe*, *hbl*, *cytK*) varlığı multipleks PCR yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla, Ehling-Schulz ve ark. (2006) tarafından önerilen amplifikasyon koşulları ve primer çiftleri kullanıldı. PCR miksi, 5 µl 10xPCR buffer, 1 µl 10 mM dNTP karışımı, 1 U Taq DNA

Polimeraz, 10 pmol/µl konsantrasyondaki her bir primerden *hbl*, *cytK* ve *nhe* genleri için sırasıyla 5 µl, 2 µl, 1,5 µl ve 6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> ilave edilerek hazırlandı. Karışımın üzerine örnek DNA'larından 1'er µl eklenerek, toplam 50 µl'lik karışım amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

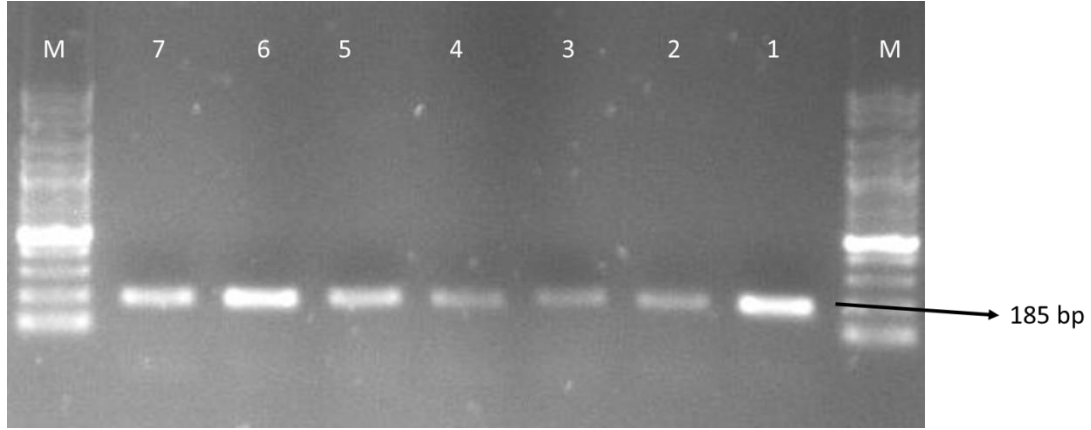
Amplifikasyon koşulları, 94 °C'de 15 dk ön denatürasyon, 30 siklus şeklinde tekrarlayan 95 °C'de 30 sn denatürasyon, 49 °C'de 30 sn primer bağlanması, 72 °C'de 1 dk primer uzaması ile son olarak, 72 °C'de 2 dk ilave uzama aşamalarını içerecek şekilde uygulandı. Elde edilen ampliconlar, %1,5'lik konsantrasyonda hazırlanan agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenerek, 120 voltta 1 saat süreyle elektroforez (CS-300V, England) işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin sonunda, her bir toksin geni için spesifik olan ampliconlar, DNA ladder yardımıyla UV transilluminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sisteminde (UVP, USA) incelendi.

#### 2.4. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatların antimikrobiyel duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu işlem, Mueller-Hinton agarda, penisilin (10 IU/disk), gentamisin (10 µg/disk), rifampin (5 µg/disk), kloramfenikol (30 µg/disk), eritromisin (15 µg/disk) ve sefoksitin (30 µg/disk) antibiyotik diskleri kullanılarak yapıldı. *B. cereus* yönünden doğrulanan ve -20 °C'de stoklanan izolatlar, Brain-Hearth Infusion Broth'a pasajlandı. Broth'lardaki bakteri yoğunluğu %0,85'lik steril fizyolojik tuzlu su ile 0,5 McFarland olarak ayarlandı. Daha sonra, kültür süspansiyonlarından steril pamuk svap ile alınarak, Mueller-Hinton Agara svap yöntemi ile inokulum yayıldı. Antibiyotik diskleri steril bir pens yardımıyla agar yüzeyi ile tamamen temas edecek şekilde eşit olarak yerleştirildi. Aerob koşullarda 37 °C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda, antibiyotik içeren disklerin çevresindeki inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek kaydedildi. CLSI (2015)'in *Staphylococcus* spp. için belirlediği kriterler dikkate alınarak, izolatlar belirtilen antibiyotiklere karşı dirençli, orta düzeyde dirençli ya da duyarlı olarak sınıflandırıldı.

### 3. Bulgular

Analize alınan toplam 75 adet peynir örneğinin 55'inde (%73,3) *B. cereus* saptandı. Yapılan moleküler analizler sonucunda, toplam 55 adet *B. cereus* izolatı elde edildi (Şekil 1). Elde edilen 55 izolatın 4'ünün (%7,2) enterotoksin oluşumundan sorumlu en az bir geni taşıdığı saptandı. Bu izolatlardan 3'ünün (%5,4) sadece *nhe* genini, 1'inin (%1,8) ise *nhe* ve *cytK* genlerini birlikte taşıdığı tespit edilirken, izolatların hiçbirisinde *hbl* genine rastlanılmadı.



**Şekil 1.** Elde edilen *B. cereus* suşlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü [M; DNA marker (100 bp), 1: Pozitif kontrol, 2-7: *B. cereus* olarak doğrulanan izolatlar (185 bp)]

*B. cereus* olarak doğrulanan 55 izolatin 6 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri araştırıldı. Antibiyotik dirençlilik sonuçları incelendiğinde, 1 izolat en az bir antibiyotiğe, 2 izolat en az iki antibiyotiğe, 11 izolat en az üç antibiyotiğe, 23 izolat en az dört antibiyotiğe, 13 izolat en az beş antibiyotiğe ve 5 izolat ise test edilen antibiyotiklerin tamamına karşı dirençli olarak saptandı. İzolatların %94,5'inin çoklu antibiyotik direnci (aynı anda üç ya da daha fazla antibiyotiğe karşı dirençlilik durumu) gösterdiği bulundu.

Çalışmada izolatların tamamı (%100) sefoksitine karşı dirençli olarak belirlendi. Bunu sırasıyla, %94,5 ile rifampin, %87,2 ile penisilin, %58,1 ile eritromisin, %56,3 ile gentamisin ve %12,7 ile kloramfenikol izledi (Tablo 2).

**Tablo 2.** İzolatların çalışmada kullanılan antibiyotiklere dirençlilik düzeyleri (n=55)

Antibiyotikler	Dirençli n (%)	Orta düzeyde dirençli n (%)	Duyarlı n (%)
<b>B-laktam grubu</b>			
Penisilin	48 (87,27)	0	7 (12,72)
Sefoksitin	55 (100)	0	0
<b>Aminoglikozidler</b>			
Gentamisin	28 (50,90)	3 (5,45)	24 (43,63)
<b>Fenikoller</b>			
Kloramfenikol	7 (12,72)	0	48 (87,27)
<b>Makrolid grubu</b>			
Eritromisin	18 (32,72)	14 (25,45)	23 (41,81)
<b>Diğerleri</b>			
Rifampin	50 (90,90)	2 (3,63)	3 (5,45)

n: pozitif izolat sayısı

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, analize alınan peynir örneklerinin *B. cereus* ile kontaminasyonun yüksek düzeyde bulunması (%73,3), üretimde kullanılan sütün yüksek düzeyde *B. cereus* sporu içermesi ile üretimde çiğ sütün kullanılması ya da yetersiz pastörizasyon ve pastörizasyon sonrası kontaminasyonlar ile açıklanabilir. Antibiyotik duyarlılık testi sonucunda, izolatların beta-laktam grubu antibiyotiklere (penisilin, sefoksitin) oldukça yüksek düzeylerde dirençli olması, *B. cereus*'un beta-laktamaz enzimi sentezleyen bir bakteri olmasından kaynaklanabilir.

Bu kapsamda, ülkemizde yürütülen çalışmaları incelediğimizde, Van'da tüketime sunulan çiğ süt ve otlu peynir örneklerinde *B. cereus* sırasıyla %10 ve %1,3 düzeylerinde saptanmıştır (Ağaoğlu ve ark., 1999). Farklı olarak, Hakkari'de üretilen otlu peynir örneklerinde *B. cereus*'a rastlanılmamıştır (Tekinşen, 2004). Ankara'da yaz aylarında satışa sunulan 120 adet pastörize süt örneğinin 56'sında (%46,6) *B. cereus* tespit edilmiştir (Özdemir, 2003). Ankara'da yürütülen başka bir araştırmaya göre, çiğ süt örneklerinin %90 düzeyinde, beyaz peynir örneklerinin ise %70 düzeyinde *B. cereus* ile kontamine olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, izolatlar beta-laktam grubu antibiyotiklere (ampisilin, penisilin) karşı dirençli olarak belirlenirken, ancak sefotaksim, kloramfenikol, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin ve tetrasikline karşı duyarlı olarak saptanmıştır (Gundogan ve Avcı, 2014). Yine, süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden izole edilen toplam 72 adet *Bacillus*'ların %41,6'sı beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilerek, beta-laktamaz pozitif suşlar sırasıyla en çok peynirden (%60), daha sonra ise pastörize süt (%26,6) ile çiğ süttten (%13,3) izole edilmiştir (Uraz ve ark., 1996).

Bursa ilinde Yıbar ve ark. (2017) analize aldıkları çiğ süt, pastörize süt ve peynir örneklerinde *B. cereus*'u sırasıyla %3,8, %26, %10,4 düzeylerinde belirleyerek, peynir örneklerinden izole ettikleri suşlarda benzer şekilde çoklu antibiyotik direncini (2 ve üzerinde antibiyotiğe dirençlilik) %90,9 olarak çok yüksek düzeylerde bulunmuştur. Çalışmamızla uyumlu olarak, en yüksek dirençlilik beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı saptanırken, kloramfenikole karşı da %10,5 düzeyinde bir dirençlilik tespit edilmiştir. Farklı olarak, izolatların tümü eritromisine karşı duyarlı olarak saptanmıştır. Ayrıca, izolatların enterotoksin üretiminden sorumlu *nhe* ve *hbl* genlerini taşıdığı bulunmuştur.

Hatay'da yöresel peynirlerde (Sürk ve Cara peynirleri) ve çiğ sütte *B. cereus* sırasıyla %16,6, %34,2 olarak saptanmıştır. Çiğ süttten elde edilen izolatların toksin geni taşımadığı, ancak peynirden izole edilen suşların bu çalışmadan daha yüksek düzeylerde olmak üzere, yalnız *nhe* genini (%60) taşıdığı belirlenmiştir (Can ve ark., 2022).

Yurt dışında yapılan çalışmaları incelediğimizde, Danimarka'daki 257 adet pastörize süt ürününün %56'sında *B. cereus* tespit edilerek, kontaminasyon düzeyinin yaz mevsiminde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Larsen ve Jorgensen, 1997).

Çin'de Wong ve ark. (1988), *B. cereus*'u pastörize süttten %2 düzeyinde izole ederken, izolatlar benzer şekilde penisilinlere yüksek düzeyde dirençli olarak saptanmıştır, ancak izolatların kloramfenikol,



eritromisin, gentamisin, kanamisin, nalidiksik asit, streptomisin ve sülfametoksazol-trimetoprim karşı duyarlı oldukları bulunmuştur. Yaklaşık 30 yıl sonra, Çin’de yapılan başka bir araştırmaya göre, pastörize süt örneklerinin %27 düzeyinde *B. cereus* ile kontamine olduğu bulunmuştur. İzolatlarda *hbl*, *cytK* ve *nhe* genleri sırasıyla %45, %73 ve %93 düzeyinde tespit edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi sonucunda, çalışmamıza benzer şekilde, izolatların büyük çoğunluğu beta-laktam grubu antibiyotikler (penisiline %99, sefoksitine %95 düzeyinde dirençli) ile rifampine (%97) dirençli olarak saptanmıştır. İzolatların tamamının gentamisin ve kloramfenikole karşı duyarlı olduğu, ancak eritromisin (%19), trimetoprim-sülfametoksazol, (%19) ve kanamisine (%15) karşı belli oranlarda direnç geliştiği ve izolatların %34 düzeyinde çoklu antibiyotik direnci gösterdiği bulunmuştur (Gao ve ark., 2018).

Batı Afrika’da üretilen yöresel peynirlerin %39’unda, çiğ süt örneklerinin %47’sinde ve yoğurt örneklerinin %35’inde *B. cereus* tespit edilerek, izolatların enterotoksin oluşumundan sorumlu genlerden en fazla *cytK* (%75), sonra ise sırasıyla *entFM* (%67), *nheABC* (%60), *hblACD* (%13) genlerini taşıdığı bulunmuştur. Benzer şekilde, izolatlar beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde dirençli olarak belirlenmiştir. Farklı olarak, izolatların tamamı rifampine karşı duyarlı olarak saptanırken, kloramfenikol direnci ise %0,01 olarak belirlenmiştir (Owusu-Kwarteng ve ark., 2017). Polonya’da marketlerde satışa sunulan taze, küflü ve olgunlaştırılmış peynirlerde *B. cereus* prevalansı sırasıyla %8,6, %52,5, %43,4 düzeylerinde, totalde ise kontaminasyon düzeyi %41,7 olarak bulunmuştur. Pastörize süt örneklerinde ise %30 düzeyinde etkene rastlanılmıştır. Peynir ve pastörize süt örneklerinden elde edilen *B. cereus* suşlarının enterotoksin üretiminden sorumlu genleri (*nhe*, *hbl*) yüksek düzeylerde (%75,9-89,1) taşıdığı tespit edilmiştir (Berthold-Pluta ve ark., 2019).

Mısır’da farklı marketlerden toplanan çiğ süt, pastörize süt ve peynir örneklerinde etken sırasıyla %85, %8,8 ve %10 düzeylerinde belirlenmiştir. Çalışmamızdan daha yüksek düzeylerde olmak üzere, *nheABC* gen kompleksi peynir izolatlarında sırasıyla %71, *hblACD* %50 ve *cytK* ise %54 düzeylerinde saptanmıştır. Mısır’da üretilen sütün %85’nin sokak sütü şeklinde satıldığı ve süt ürünlerinin halen geleneksel yöntemlerle üretildiği belirtilerek, süt ve ürünlerindeki toksijenik *B. cereus* suşlarının halk sağlığı açısından tehlike oluşturabileceği bildirilmiştir (Hammad ve ark., 2021).

Ahmed ve ark. (1983) tarafından incelenen 400 adet süt ve ürünlerinde, *B. cereus* sırasıyla çiğ süt, pastörize süt ve Cedar peynir örneklerinde %9, %35 ve %14 düzeylerinde saptanırken, yoğurtta belirlenememiştir. Hollanda’da analize alınan pastörize süt örneklerinde *B. cereus* %40 oranında saptanırken (Te Giffel ve ark., 1997), süt ve ürünlerinde %10 düzeyinde (Wijnands ve ark., 2006) bulunmuştur.

Doğu Etiyopya’daki marketlerde satılan çiğ süt örneklerinin %38,8 düzeyinde *B. cereus* ile kontamine olduğu ve pozitif örneklerden izole edilen suşların yüksek düzeyde beta-laktam grubu antibiyotiklere (penisilin ve ampisiline %100, amoksilin ve sefoksitine %80 düzeyinde dirençli) karşı dirençli oldukları bulunmuştur (Abraha ve ark., 2017).

Farklı olarak, Wijnands ve ark. (2006) süt ve ürünlerinden elde ettikleri izolatların %30 düzeyinde sadece *nhe*, %1,3 düzeyinde sadece *hbl* genini taşıdığını bulmuşlar, ancak *cytK* genine izolatlarda diğer toksin genleri ile birlikte rastlanılmıştır. İzolatlarda *nhe* ve *cytK* genlerinin birlikte bulunma düzeyi %7,5 olarak saptanırken, izolatların *hbl-nhe-cytK* genlerini aynı anda %20 düzeyinde taşıdığı belirlenmiştir.

Çalışmadan daha düşük düzeylerde olmak üzere, Meksika'ya özgü ve çiğ sütten yapılan peynirlerin %29,4 düzeyinde *B. cereus* ile kontamine olduğu belirlenerek, ancak elde edilen izolatların yüksek oranda (%91,3) toksijenik özelliğe sahip olduğu bulunmuştur (Adame-Gomez ve ark., 2020).

Tunus'ta 2014-2015 yılları arasında toplanan toplam 84 adet süt ürününde (çiğ süt, tereyağı ve peynir) *B. cereus* oldukça düşük düzeylerde (%4,8) tespit edilerek, filogenetik sınıflandırmada süt ürünlerinden elde edilen izolatların tamamı yetersiz sanitasyonu temsil eden oldukça riskli grupta yer almıştır (Gdoura-Ben Amor ve ark., 2018).

Sonuç olarak, gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonların şekillenmesinde süt ve ürünleri özellikle de çiğ sütten üretilen peynirler bu kapsamda önemli bir risk oluşturulabilir. Çiğ süt *B. cereus* ile sıklıkla kontamine olabilmekte ve böyle sütlerin peynir üretiminde kullanılması ile etken son ürüne gecebilmektedir. Sporlu bir bakteri olması, toksin üretebilmesi ve bazı suşlarının buzdolabı sıcaklığında da gelişebilmesi dolayısıyla, süt ve ürünlerinde etken infeksiif doza ulaşabilir. Etkeni gıda zincirinden tamamen elimine etmek zor olmakla birlikte, bu amaçla, birtakım koruyucu önlemler alınabilir. Peynir retiminde kullanılacak sütün sağlıklı hayvanlardan hijyenik şartlarda elde edilmesi, pastörize edilerek kullanılması ve pastörizasyon sonrasında rekontaminasyonların engellenmesi, ayrıca peynir üretiminde yüksek asitliğin sağlanması, tuzun kullanılması, nakliye ve satış esnasında soğuk muhafazanın sağlanması gibi koruyucu önlemler ile etkenin gelişimi sınırlandırılabilir. Bununla birlikte, çalışmada antibiyotiklere dirençli suşların izole edilmesi sonucunda bu suşlar aracılığıyla antibiyotik direncinden sorumlu genler floradaki diğer patojen bakterilere aktarılabilir. Bu kapsamda, hayvan yetiştiriciliği ve hayvansal üretimde antibiyotiklerin daha bilinçli kullanılması gerekmektedir.

### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

### **Araştırmaçılarının Katkı Oranı Beyan zeti**

Yazarlar makaleye benzer oranda katkı sağlamış olduğunu beyan eder.

### **Kaynakça**

Abraha A., Bikila T., Alemu S., Muktar Y. *Bacillus cereus* isolation and load from raw cow milk sold in markets of Haramaya District, eastern Ethiopia. International Journal of Food Contamination 2017; 4: 15.

Adame-Gmez R., Muoz-Barrios S., Castro-Alarcn N., Leyva-Vzquez MA., Toribio-Jimnez J.,

- Ramírez-Peralta A. Prevalence of the strains of *Bacillus cereus* group in artisanal Mexican cheese. *Foodborne Pathogens and Disease* 2020; 17(1): 8-14.
- Ağaoğlu S., Alemdar S., Ekici K., Güdücüoğlu H. Çiğ süt ve bazı süt ürünlerinde *Bacillus cereus*'un varlığının araştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi* 1999; 9(1): 5-7.
- Ahmed AA., Moustafa MK., Marth EH. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. *Journal of Food Protection* 1983; 46(2): 126-128.
- Becker H., Schaller G., von Wiese W., Terplan G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology* 1994; 23: 1-15.
- Berthold-Pluta A., Pluta A., Garbowska M., Stefańska I. Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. *Foods* 2019; 8(7): 269.
- Can HY., Elmalı M., Karagöz A., Dişli HB. Psychrotrophic properties, toxigenic characteristics, and PFGE profiles of *Bacillus cereus* isolated from different foods and spices. *Ciência Rural* 2022; 52(4): 1-11.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement, M100-S25.
- Ehling-Schulz M., Guinebretiere MH., Monthán A., Berge O., Fricker M., Svensson B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* 2006; 260(2): 232-240.
- Gao T., Ding Y., Wu Q., Wang J., Zhang J., Yu S., Yu P., Liu C., Kong L., Feng Z., Chen M., Wu S., Zeng H., Wu H. Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9: 533.
- Gdoura-Ben Amor M., Siala M., Zayani M., Grosset N., Smaoui S., Messadi-Akrout F., Baron F., Jan S., Gautier M., Gdoura R. Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9: 447.
- Gundogan N., Avci E. Occurrence and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology* 2014; 67(4): 562-569.
- Hammad AM., Eltahan A., Khalifa E., Abbas NH., Shimamoto T. Toxigenic potential of *Bacillus cereus* strains isolated from retail dairy products in Egypt. *Foodborne Pathogens and Disease* 2021; 18(9): 655-660.
- Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* 2000; 2: 189-198.
- Larsen HD., Jørgensen K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 1997; 34(2): 179-186.

- Liu XY., Hu Q., Xu F., Ding SY., Zhu K. Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China. *Toxins (Basel)*, 2020; 12(7): 454.
- Logan NA. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology* 2012; 112(3): 417-29.
- Magnusson M., Christiansson A., Svensson B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: Factors affecting contamination of raw milk. *Journal of Dairy Science* 2007; 90(6): 2745-2754.
- McKillip JL. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000; 77: 393-399.
- Owusu-Kwarteng J., Wuni A., Akabanda F., Tano-Debrah K., Jespersen L. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiology* 2017; 17(1): 65.
- Özdemir H. Pastörize sütlerde *Bacillus cereus*'un varlığı. *Gıda* 2003; 28(6): 611-614.
- Pei X., Yang S., Zhan L., Zhu J., Song X., Hu X., Liu G., Ma G., Li N., Yang D. Prevalence of *Bacillus cereus* in powdered infant and powdered follow-up formula in China. *Food Control* 2018; 93: 101-105.
- Pretorius C., Buys EM. Extended shelf life milk processing: Effect of simulated cleaning in place on the germination and attachment of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Dairy Technology* 2021; 74(1): 75-83.
- Schiefer B., Macdonald KR., Klavano GG., van Dreumel AA. Pathology of *Bacillus cereus* mastitis in dairy cows. *Canadian Veterinary Journal* 1976; 17(9): 239-243.
- Stenfors Arnesen LP., Fagerlund A., Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters* 2008; 32(4): 579-606.
- Tallent SM., Kotewicz KM., Strain EA., Bennett RW. Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC International* 2012; 95(2): 446-451.
- Te Giffel MCT., Beumer RR., Granum PE., Rombouts FM. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* 1997; 34(3): 307-318.
- Tekinşen KK. Microbiological and chemical quality of herb cheese manufactured in Hakkari. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 2004; 20(2): 79-85.
- Tewari A., Abdullah S. *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *Journal of Food Science and Technology* 2015; 52(5): 2500-2511.
- Uraz A., Arslan S., Gündoğan N. Çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden izole edilen ve iyodometrik test yöntemiyle beta-laktamaz varlığı saptanan *Bacillus* türleri. *Gıda* 1996; 21(4): 275-280.
- Walker-York-Moore L., Moore SC., Fox EM. Characterization of enterotoxigenic *Bacillus cereus sensu lato* and *Staphylococcus aureus* isolates and associated enterotoxin production dynamics in milk or meat-based broth. *Toxins (Basel)* 2017; 9(7): 225.

- Wang RF., Cao WW., Cerniglia CE. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology* 1997; 83(6): 727-736.
- WHO, Dünya Sağlık Örgütü. 2020. Antibiotic resistance.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Erişim tarihi: 25.10.2022.
- WHO, Dünya Sağlık Örgütü. 2021. Antimicrobial resistance.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Erişim tarihi: 25.10.2022.
- Wijnands LM., Dufrenne JB., Rombouts FM., in 't Veld PH., van Leusden FM. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. *Journal of Food Protection* 2006; 69(11): 2587-2594.
- Wong HC., Chang MH., Fan JY. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; 54(3): 699-702.
- Yıbar A., Çetinkaya F., Soyutemiz E., Yaman G. Prevalence, enterotoxin production and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from milk and cheese. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017; 23 (4): 635-642.