

Sünme (Rope) Problemi Olan Ekmeklerden İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Enterotoksin Üretme Potansiyeli

Fundagül Erem¹ , Muharrem Certel²  ✉, Barçın Karakaş Budak² 

¹Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 67900, Çaycuma, Zonguldak

²Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 07059, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 02.08.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 27.02.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): certel@akdeniz.edu.tr (M. Certel)

☎ 0 242 310 24 27 📠 0 242 227 45 64

ÖZ

Bu çalışmada, daha önceki bir çalışmamızda sünme (rope) hastalığı olmuş ekmek içlerinden izole edilen *Bacillus* türleri, hemolitik (Hbl) ve hemolitik olmayan (Nhe) enterotoksin üretimleri açısından incelenmiştir. İncelenen toplam 39 izolatın sadece birinin hem Hbl hem de Nhe enterotoksinlerini, 22 izolatın sadece Hbl, 2 izolatın ise sadece Nhe enterotoksinini üretme kapasitesinin olduğu, kalan 14 izolatın ise her iki enterotoksini de üretmedikleri tespit edilmiştir. Enterotoksin analizleri için pozitif kontrol suşu olarak, her iki enterotoksini de ürettiği bilinen *Bacillus cereus* 2248 kullanılmıştır. Toksin analizleri, standart suşlar olan *Bacillus subtilis* PY22, *B. subtilis* RSK 244 ve *B. subtilis* RSK 246 için de yapılmış, aralarından sadece *B. subtilis* RSK 246'nın Nhe enterotoksinini üretme potansiyelinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca emetik toksin ürettiği bilinen *Bacillus cereus* 2455/2 suşu da Nhe enterotoksini açısından pozitif sonuç vermiştir. Sonuçlar, ekmeklerde sünme (rope) hastalığından sorumlu olan *Bacillus* türlerinin enterotoksin üretebileceğini gösterir niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Sünmüş ekmek, *Bacillus*, Enterotoksin

Enterotoxin Production Potential of *Bacillus* Species Isolated from Ropy Bread

ABSTRACT

In this study, *Bacillus* species isolated from ropy bread crumb in our previous study were investigated for the production of hemolytic (Hbl) and non-hemolytic (Nhe) enterotoxins. Of the 39 isolates, only one produced both Hbl and Nhe enterotoxins, 22 produced only Hbl, 2 produced only Nhe and the remaining 14 isolates were found to produce none of the two enterotoxins. *Bacillus cereus* 2248, which is known to produce both Hbl and Nhe, was used as the positive control strain for the enterotoxin assays. Toxin assays were also performed for the standard strains *Bacillus subtilis* PY22, *B. subtilis* RSK 244 and *B. subtilis* RSK 246. It was determined that amongst these strains only *B. subtilis* RSK 246 has the potential of producing the Nhe enterotoxin. Furthermore, the test results of *Bacillus cereus* 2455/2, which is known as an emetic strain, have shown that the strain was potentially positive in terms of Nhe enterotoxin. The results showed that *Bacillus* strains that are responsible for rope disease in bread could produce enterotoxins.

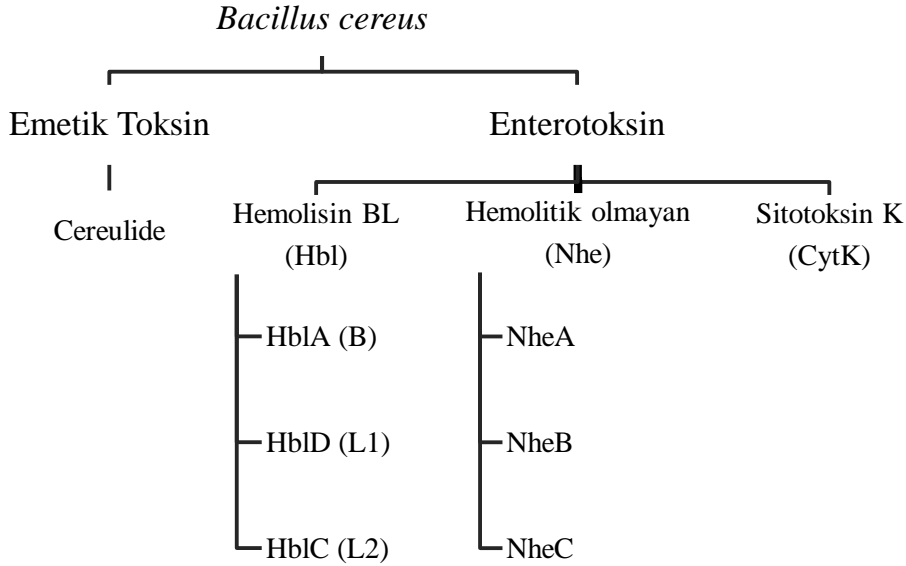
Keywords: Ropy bread, *Bacillus*, Enterotoxin

GİRİŞ

Bacillus cinsi bünyesinde, çoğunlukla güvenilir olduğu kabul edilen (GRAS) türler olmasına rağmen aralarında patojen olan türler de bulunmaktadır ve bunlar genetik olarak da benzerlik arz etmektedir. *Bacillus anthracis* memelilerde antraksa, insektisidal özelliği sebebiyle yaygın olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis* ise gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır. Ürettiği toksinler aracılığı ile gıda zehirlenmesine neden olan *Bacillus cereus*, ayrıca endoftalmis (gözün iç dokularının iltihaplanması), endokardit (kalp iç zarının iltihaplanması), menenjit (beyin zarının iltihaplanması), periodontit (diş dokularının iltihaplanması), osteomyelit (kemik iliğinin iltihaplanması), yara enfeksiyonları ve septisemi (kan zehirlenmesi) gibi lokal ve sistemik enfeksiyonlara da neden olmaktadır [1]. Bunların yanı sıra, daha az bilinmekle birlikte, birçok endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılan *B. licheniformis*,

B. subtilis, *B. mojavensis*, *B. pumilus* ve *B. fusiformis* gibi türlerin de toksin üretebildiği ve gıda zehirlenmelerine neden olabildiği belirlenmiştir [2-4]. *Bacillus cereus* tarafından üretilen toksinler, diyarel (ishale sebep olan) ve emetik (kusmaya sebep olan) sendrom olarak ifade edilen iki farklı tipte gıda zehirlenmesine neden olmaktadır. *Bacillus cereus* toksinlerinin sınıflandırılması Şekil 1'de verilmiştir.

Diyarel sendrom, bakterinin ince bağırsakta ürettiği, ısıya karşı dayanıklı olmayan enterotoksin aracılığı ile oluşmakta, epitel hücrelere etki ederek bağırsakta aşırı miktarda sıvı salgılanmasına ve bunun sonucu olarak da diyareye neden olmaktadır [5]. Bakterinin kendi gelişim evresi açısından bakıldığında ise enterotoksin, vejetatif büyüme esnasında, temel olarak da logaritmik fazın sonlarında üretilmektedir [6].



Şekil 1. *Bacillus cereus* toksinlerinin sınıflandırılması

Hücre membranında delikler açılmasına neden olarak diyarel hastalıklara sebep olan en önemli üç enterotoksinin hemolisin BL [hemolitik (Hbl)], Nhe (hemolitik olmayan) ve CytK (sitotoksin K) olduğu belirtilmektedir [7]. Hbl, 3 farklı alt bileşenden (B, L₁, L₂) oluşmaktadır. Bunlardan HblB bağlayıcı (binding), HblL₁ ve HblL₂ parçalayıcı (lytic) bileşen olarak bilinmektedir. Protein yapısındaki bu üç farklı bileşen, birbirinden bağımsız olarak salgılanmaktadır ve toksinin maksimum biyolojik aktivite gösterebilmesi için üç bileşen de gerekmektedir. Nhe de Hbl gibi birbirlerinden bağımsız olarak salgılanan üç alt bileşenden (A, B, C) oluşmaktadır ve neredeyse bütün *B. cereus* suşları tarafından üretilmektedir. NheB, enterotoksin kompleksinin bağlayıcı bileşenidir. Maksimum toksik aktivitenin oluşabilmesi için NheA, NheB ve NheC'nin molar oranlarının 10:10:1 olması gerekmektedir, NheC'nin oranının artması Nhe'nin toksik aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır [7, 8]. Nhe, diyarel toksin olarak bilinmesine rağmen yakın zamanda Cai ve ark. [9] tarafından yapılan bir çalışmada Nhe'nin diyarel

sendroma herhangi bir katkısının olmadığı belirtilmiştir. CytK ise tek bileşenli, hücre zarında β-fıçısı (β-barrel) yapısında por oluşturan, hemolitik bir toksindir [7, 8] ve bazen hemolisin IV olarak isimlendirilmektedir [9].

Enterotoksin T (bceT) ve Enterotoksin FM isimli, tek bileşenli iki enterotoksinin daha varlığı öne sürülmüştür. Bunlardan bceT geni ilk olarak Agata ve ark. [10] tarafından tanımlanmış ve gıda kaynaklı diyareye neden olabileceği bildirilmiştir. Ancak daha sonra bu gen ile çalışan diğer araştırmacılar Choma ve Granum [11], bceT geninin ya bilinenden farklı bir enterotoksik aktivitesi olduğunu ya da hiç olmadığını savunmuş; Hansen ve ark. [12] ise Agata ve ark.'nın [10] belirlediği gen diziliminin yalnızca bir kısmının kendi belirledikleri ile homoloji gösterdiğini, bceT için tespit edilen enterotoksik aktivitenin ya füzyon genden ya da ligasyon sırasında gerçekleşen hatadan dolayı *B. anthracis*'in açık okuma alanı ile homoloji gösteren fragmandan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Enterotoksin FM1 geni ise Asano ve ark. [13] tarafından *B. cereus* FM1 ve

B. thuringiensis'den klonlanmıştır. Ancak bu gene ait dizilimin *B. subtilis*'in hücre duvarındaki hidrolazın dizilimi ile homoloji gösterdiği belirlendiğinden muhtemelen enterotoksin olmadığı vurgulanmıştır [5].

B. cereus'un neden olduğu gıda zehirlenmesi türlerinden olan emetik sendrom ise "sereulid" adı verilen, küçük, ısı ve aside karşı dayanıklı, sulu çözeltilerde çözünmeyen, halkalı yapıdaki dodekadepsipeptid aracılığı ile oluşmaktadır [14, 15]. Vejetatif büyüme esnasında gıdada üretilen toksin, kararlı yapısı nedeniyle gıdanın tüketilmesinden sonra mide asidi ve intestinal proteolitik enzimlerden de etkilenmemekte ve on iki parmak bağırsağında 5-HT₃ reseptörüne bağlanarak bulantı ve kusmaya neden olmaktadır [16]. Sereulid'in vakuol oluşumuna neden olduğu ve vakuolün de mitokondrial şişmeye yol açtığı, ayrıca solunumun kontrolünü yavaşlattığı bildirilmiştir [1, 17].

Ekmeklerde sünme, özellikle nemli ve sıcak iklime sahip bölgelerde görülen, *Bacillus* kaynaklı bir hastalıktır. Pişirme sıcaklığında spor oluşturarak canlı kalan *Bacillus* türlerinin daha sonra vejetatif hale geçmesi ve ekmekte istenmeyen değişikliklere neden olması sonucunda oluşmaktadır [18-22]. Bu çalışmada, endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılan *Bacillus* türlerinin de toksin üretebileceği gerçeğinden hareketle, daha önceki bir çalışmamızda [23] sünmüş ekmeklerin içinden izole edilmiş olan *Bacillus* türlerinin enterotoksin üretip üretmediğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Sünme etmeni *Bacillus* türlerine ait spor sayısının 1 g ekmekte yaklaşık 10⁶-10⁹ seviyesine ulaşması durumunda (her ne kadar görünüş ve kokusu itibari ile sünmüş ekmeğin tüketilmesi söz konusu olmasa da) bulantı, kusma, ishal, baş ağrısı gibi belirtilerle, gıda zehirlenme vakaları görülebileceği bilinmektedir [24]. İzole edilmiş olan bu türlerden, gıda endüstrisi başta olmak üzere çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek peptidaz ve amilaz gibi enzimler başta olmak üzere çeşitli metabolit madde üretiminde yararlanılması planlandığından, bu *Bacillus* türlerinin enterotoksin üretimi açısından test edilmelerinin faydalı olacağı düşünülmüştür. Bu sayede ayrıca sünme etmeni *Bacillus* türlerinin toksik etkisine Hbl ve Nhe enterotoksinlerinin katkısı olup olmadığı da tespit edilmiş olacaktır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Araştırma kapsamında kullanılan *Bacillus* suşları, Erem ve ark. [23] tarafından sünme (rope) hastalığı oluşmuş ekmeklerden izole edilip klasik testler ve API test kitleri ile tanımlanmıştır. Söz konusu çalışmada yapılan tanımlama sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Kontrol suşları olarak kullanılan *Bacillus cereus* 2248 (enterotoksijenik suş) ve *Bacillus cereus* 2455/2 (emetik suş) Helsinki Üniversitesi HAMBİ Kültür Koleksiyonu'ndan (<http://www.helsinki.fi/hambi/>), *Bacillus subtilis* RSK 244 ve *Bacillus subtilis* RSK 246 suşları Refik Saydam Hifzısıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilmiş; *Bacillus subtilis* PY22

suşu ise daha önce bir tez çalışmasında [25] kullanılmış olup araştırmacılar tarafından sağlanmıştır.

Yöntem

Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Mevcut bakteriler 50 mL nutrient broth (NB) içeren engelli erlenlerde 37°C'de 200 devir/dakika çalkalama ile 18 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda bakterilerin optik yoğunluğu 600 nm dalga boyunda ölçülmüş ve içerisinde 50 mL brain heart infusion broth (BHIB) bulunan engelli erlenlere, her bir bakterinin başlangıç optik yoğunluğu (OD) 0.1 olacak şekilde, hesaplanan hacimlerde inokülasyon yapılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific, Excella E24, ABD) 37°C'de 200 devir/dakika çalkalama ile 18 saat inkübasyonun ardından bakteri hücrelerini ayırmak için hücre kültürü santrifüjlenmiş (10000 × g, 10 dakika, 4°C) ve supernatant ayrılarak analizlerde kullanılmıştır. *Bacillus* diyarel enterotoksini cama yapışabildiğinden yapılan analizlerde polipropilen (PP) veya polikarbonat (PC) malzemeler kullanılmıştır.

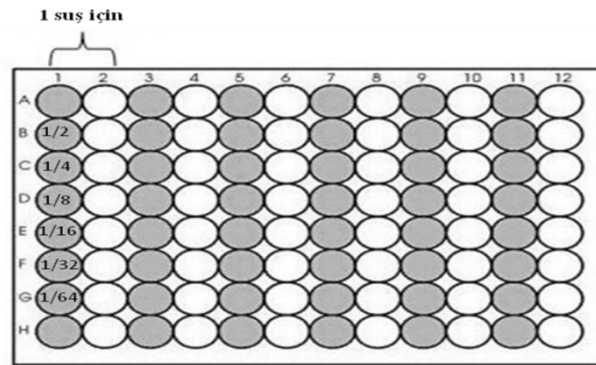
BCET-RPLA İle Enterotoksin Tespiti

BCET-RPLA (*Bacillus cereus* enterotoxin-reversed phase latex agglutination) kiti (Oxoid, İngiltere) ile gerçekleştirilen, *Bacillus cereus* diyarel enterotoksin (hemolitik toksin) testi için V tabanlı 96 kuyucuklu mikroparka, her bir suş için ise mikroparkada 2 sütun kullanılmıştır. Mikroparkanın şematik gösterimi Şekil 2'de verilmiştir.

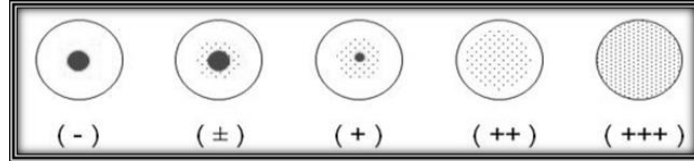
Öncelikle A satırı hariç olmak üzere, kullanılacak olan tüm kuyucuklara kitle birlikte gelen seyreltme çözeltilisinden (sığır serum albümini içeren tuzlu fosfat tamponu) 25 µL koyulmuştur. Ardından A ve B satırlarındaki tüm kuyucuklara 25 µL test örneği (supernatant) ilave edilmiş, plaka hafif sallanarak seyreltme çözeltilisi ile test örneğinin karışması sağlanmıştır. Daha sonra B satırından başlanarak her bir kuyucuktan 25 µL örnek alınmış ve aynı sütun boyunca kendinden sonraki satırdaki kuyucuğa aktararak test örneğinin seyreltilmesi sağlanmıştır. Seyreltme işlemine H satırına kadar devam edilmiştir. Bu durumda; A satırındaki tüm kuyucuklarda sadece test örneği, H satırındaki tüm kuyucuklarda sadece seyreltme çözeltilisi, ara satırlarda ise farklı oranlarda seyreltilmiş test örneğinin olması sağlanmıştır. Daha sonra her bir suş için ilk sütundaki kuyucuklara duyarlı lateks (sensitized latex), ikinci sütundaki kuyucuklara ise kontrol lateks (latex control) çözeltilisinden ilave edilmiştir. Plakanın kapağı kapatılarak siyah zemin üzerinde, oda sıcaklığında, 20-24 saat bekletilmiş ve süre sonunda kuyucuklarda çökme olup olmadığı incelenmiştir [26]. Çökme durumuna göre sonuç değerlendirilmesi Şekil 3'e göre yapılmıştır. Analizlerde *Bacillus cereus* 2248 (Agata ve ark. [10] bu suşu B-4ac olarak kodlamışlardır) enterotoksin açısından referans suş olarak kullanılmış, ayrıca kitle birlikte gelen pozitif kontrolden de (liyofilize edilmiş *Bacillus cereus* enterotoksini) bu amaçla yararlanılmıştır.

Tablo 1. Sünmüş ekmekten elde edilen izolatlara ait tanımlama sonuçları [23]

İzolatlar	Biyokimyasal testler	API CH	API tanımlama düzeyi
N1	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	İyi tanımlama
N2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	Çok iyi tanımlama
N3	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	İyi tanımlama
N4	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N5	<i>B. megaterium</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N6	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	İyi tanımlama
N7	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	Kabul edilemez profil / <i>B. megaterium</i> olasılığı
N8	<i>B. megaterium</i>	<i>B. licheniformis</i>	İyi tanımlama
N9	<i>B. coagulans</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N10	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	Mükemmel tanımlama
N11	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N12	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N13	<i>B. coagulans</i>	<i>B. licheniformis</i>	İyi tanımlama
N14	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N15	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N16	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N17	<i>B. megaterium</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N18	<i>B. megaterium</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N19	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	Çok iyi tanımlama
N20	<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>	Mükemmel tanımlama
N21	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
N22	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
K1	<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Cins bazında iyi tanımlama
K2	Tanımlanamadı	<i>B. licheniformis</i>	Çok iyi tanımlama
K3	Tanımlanamadı	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
K4	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
K5	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
K6	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	Çok iyi tanımlama
K7	<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Cins bazında iyi tanımlama
K8	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	Kabul edilemez profil / <i>B. megaterium</i> olasılığı
K9	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	İyi tanımlama
K10	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	Çok iyi tanımlama
K11	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	Kabul edilemez profil / <i>B. megaterium</i> olasılığı
K12	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	Kabul edilemez profil / <i>B. megaterium</i> olasılığı
K13	<i>B. megaterium</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
K14	<i>B. megaterium</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
K15	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	Çok iyi tanımlama
K16	<i>B. subtilis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	Kabul edilemez profil / <i>B. thuringiensis</i> olasılığı
K17	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	İyi tanımlama
K18	<i>B. subtilis</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil
K19	<i>B. megaterium</i>	Tanımlanamadı	Kabul edilemez profil



Şekil 2. BCET-RPLA kiti için mikrolaka

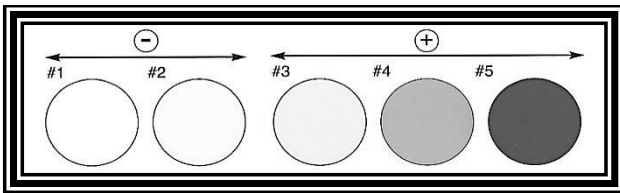


Şekil 3. BCET-RPLA kiti sonuç değerlendirme şeması (Çökeltiler pembe renkli gözlenmektedir)

BDEVIA İle Enterotoksin Tespiti

BDEVIA (*Bacillus* diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay) kiti (3M Tecra, ABD) ile gerçekleştirilen, *Bacillus cereus* diyareal enterotoksin (hemolitik olmayan toksin) testi için kitle birlikte gelen antikor kaplı kuyucuklar kullanılmıştır.

Tablaya yerleştirilen kuyucuklara öncelikle yıkama çözeltisinden doldurularak 20-25°C'de 10 dak beklenmiştir. Süre sonunda yıkama çözeltisi boşaltılmış ve kuyucuklara 200 µL örnek çözeltisi ile pozitif kontrol (PC) ve negatif kontrol (NC) koyularak 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon bitiminde mikropilaka yıkayıcı (BioTek ELx800, ABD) kullanılarak yıkama çözeltisi ile kuyucuklar 4 kez yıkanmıştır. Ardından kuyucuklara eşlenik çözelti (conjugate) eklenip 20-25°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar mikropilaka yıkayıcı ile 5 kez yıkanmış, 200 µL substrat çözeltisi eklenerek 20-25°C'de 30 dak süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda rengin dağılması için plaka yavaşça sallanmış ve Şekil 4.'deki renk kartı kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. Testin geçerli olması için PC'nin rengi en az #4 kadar koyu, NC'nin rengi ise en fazla #2 kadar koyu olmalıdır. PC'nin rengi en az #4 kadar koyu ise tepkimeyi sonlandırmak için kuyucuklara 20 µL durdurma (stop) çözeltisi eklenmiş ve mikropilaka okuyucu (BioTek µQuant Monochromatic Spectrophotometer, ABD) ile PC'nin maksimum absorbans verdiği belirlenen 420 nm dalga boyunda 30 dak. içinde okuma yapılmıştır [27]. Absorbansı 0.2'den daha büyük olan örnekler test açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4. BDEVIA kitinin sonuç değerlendirme renk kartı (Renk geçişi saydamdan koyu yeşile doğrudur.)

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, daha önceki bir çalışmada izole edilmiş olan *Bacillus* izolatlarının toksin üretip üretmediklerinin belirlenmesinin nedeni, bu izolatların gıda endüstrisi başta olmak üzere çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğinin araştırılmasına olanak sağlayabilmektir. Bu izolatlar aracılığı ile üretilen maddelerin (enzim vs.) endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği ancak GRAS statüde izolatlardan yararlanılması ile mümkün olmaktadır. Bu amaçla toksin üretme kapasitesinde olan izolatların, endüstriyel

uygulamalarda kullanılabilecek maddelerin üretiminden önce elenmesi sağlanmıştır.

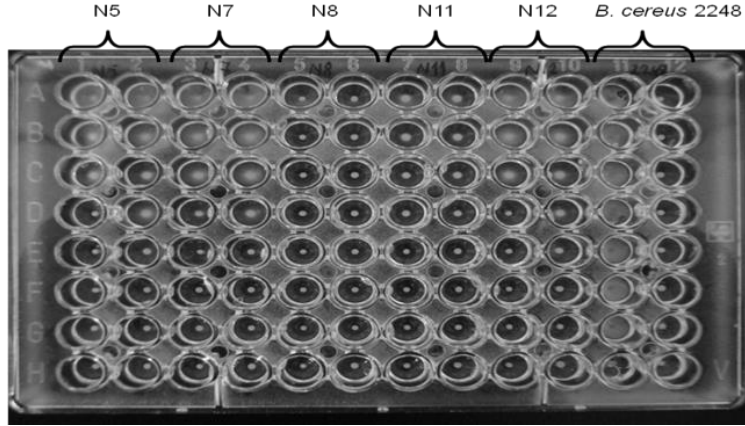
BCET-RPLA kiti Hbl alt birimlerinden L₂'yi, BDEVIA kiti ise Nhe alt birimlerinden NheA'yı tespit edebilmektedir. Her iki enterotoksin de üç alt birimden oluşmakta ve maksimum biyolojik aktivite için her üç alt birimin birden bulunması gerekmektedir [5, 7]. Testlerle L₂ ve NheA'nın tespit edilmemesi durumunda toksinlerin üretilmediği sonucuna varılabilmektedir. Ancak söz konusu alt birimlerin varlıklarının belirlenmesi, kesin olarak aktif toksinin üretilebileceği anlamına gelmemektedir [5]. Dolayısıyla bu çalışmada kesin olarak bu toksinleri üretmeyecek olan izolatların seçilmesi hedeflenmiş ve alt birimlerin tespit edilmediği izolatlarla, farklı çalışmalara devam edilebileceği öngörülmüştür.

BCET-RPLA kiti sonuçları, mikro plakada çökme olup olmadığı gözlenerek değerlendirilmektedir. İzolatın Hbl enterotoksini açısından pozitif olarak değerlendirilebilmesi için, normal koşullarda, duyarlı lateks içeren 1. sütundaki kuyucuklarda çökme olması, ancak kontrol lateksi içeren 2. sütundaki kuyucuklarda çökme olmaması gerekmektedir. Nitekim pozitif kontrol suş olarak kullanılan enterotoksik suş *B. cereus* 2248 ve saf toksin için çökme durumu aynen bu şekilde sonuçlanmıştır. İzolatın negatif olarak değerlendirilebilmesi için ise her iki sütundaki kuyucuklarda da çökme olmaması gerekmektedir. Bu çalışmada negatif izolatların değerlendirilmesinde sorun yaşanmamış, her iki sütunda çökme gözlenmeyen izolatlar Hbl enterotoksini üretmesi bakımından negatif olarak kabul edilmiştir. Ancak bunların dışındaki izolatlarda hem 1. hem de 2. sütundaki kuyucuklarda çökme olduğundan, bu izolatların değerlendirilmesinde sıkıntılar yaşanmıştır. Toksin kitinin kullanma kılavuzunda bazen kontrol lateksde spesifik olmayan çökmeler gözlenebileceği, bu durumda; duyarlı lateksdeki çökmenin, kontrol latekse göre daha ileri seyreltme düzeylerinde olması şartıyla sonucun pozitif olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir [20]. Fakat bunun tam tersi olarak, genellikle, kontrol lateksdeki çökmenin duyarlı lateksdekine göre daha ileri seyreltme düzeylerinde olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla bu izolatlar için elde edilen sonuçlar ne pozitiflik ne de negatiflik kurallarıyla tam olarak uyum sağlamıştır. Bu izolatların hiçbirindeki çökme, enterotoksin açısından pozitif kontrol suşu olan *B. cereus* 2248 veya saf toksinin çökme durumu ile benzerlik arz etmemesine rağmen, sonuçlar negatif olarak da değerlendirilemediği için, risk almamak adına bu izolatların tamamının Hbl enterotoksini açısından "muhtemel pozitif" olarak kabul edilmesine karar verilmiştir. Çökme durumunun farklı şekilde gerçekleşmesinin *B. cereus* dışındaki izolatların toksin yapısının farklılığından kaynaklanabileceği

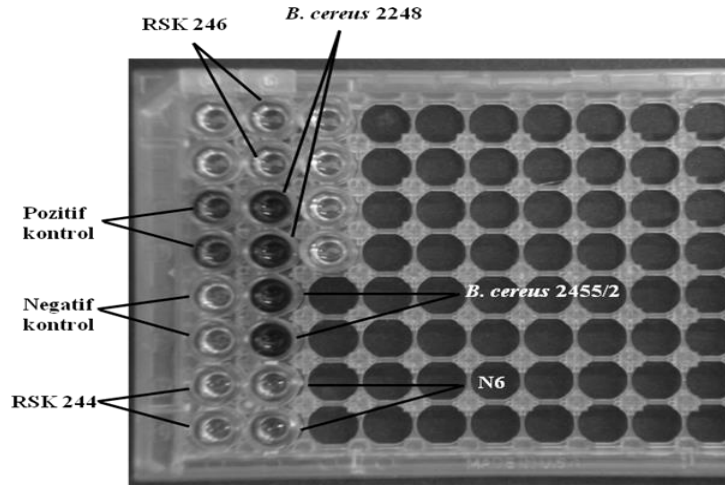
düşünülmektedir. Çökme durumunun nasıl olduğunun anlaşılması için bazı izolatlar için BCET-RPLA sonuçları Şekil 5'de gösterilmiştir.

Nhe enterotoksininin tespiti (BDEVIA) Hbl enterotoksinine göre daha rahat yapılmış, renk kartı ile yapılan değerlendirmenin, absorpsiyon ölçümü ile de desteklenmesi sonuçların yorumlanmasını kolaylaştırmıştır. Bazı izolatlar için test sonuçları Şekil 6'da gösterilmiştir. Emetik suş olan *B. cereus* 2455/2'nin

Nhe enterotoksini açısından da pozitif olduğu Şekil 6'da görülmektedir. Bu sonuç, emetik toksin üreten *B. cereus* suşlarının nhe genini taşıdıklarını ve genellikle Nhe enterotoksinini de ürettiklerini belirleyen diğer araştırma sonuçları [15, 28, 29] ile uyum sağlamaktadır. Dolayısıyla emetik toksin üreten suşlar da diyareye neden olabilmektedir. Ayrıca standart suş olarak kullanılan *Bacillus subtilis* RSK 246'nın da Nhe enterotoksinini üretebildiği belirlenmiştir.



Şekil 5. Bazı *Bacillus* izolatları için BCET-RPLA sonuçları (Çöktürmeler pembe renklidir)



Şekil 6. Bazı *Bacillus* izolatları için BDEVIA sonuçları (Pozitif suşlar için renk değişimleri yeşilin tonları şeklindedir)

Yukarıda yapılan açıklamalar doğrultusunda, sünmüş ekmeklerden izole edilen izolatlar ile kontrol suşları için BCET-RPLA ve BDEVIA kitleri kullanılarak yapılan enterotoksin analizi sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Sünmüş ekmeklerden izole edilmiş olan izolatlardan sadece bir tanesinin (N6) hem Hbl hem de Nhe enterotoksinlerini, 22 tanesinin sadece Hbl, 2 tanesinin de (N10, N13) sadece Nhe enterotoksinini üretebilme kapasitesinde oldukları tespit edilmiştir.

Daha önce yapmış olduğumuz çalışmada [23] sünmüş ekmeklerden elde edilen izolatların tanımlama

sonuçlarının gösterildiği Tablo 1 ile karşılaştırma yapıldığında sadece Hbl enterotoksini ürettiği tespit edilen izolatların çoğunlukla *B. subtilis* ve *B. megaterium* olarak tanımlandığı, sadece Nhe enterotoksinini üreten izolatlardan N13 kodlu izolatın biyokimyasal testlerle *B. coagulans*, API test kitleri ile *B. licheniformis* olarak; N10'un ise her iki yöntemle *B. licheniformis* olarak tanımlandığı görülmektedir. Her iki enterotoksini birden üreten N6 kodlu izolat ise klasik testlerle *B. subtilis*, API test kiti ile *B. pumilus* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 2. *Bacillus* izolatlarının enterotoksin analizi sonuçları

İzolat	BCET-RPLA (Hbl) ^a	BDEVIA (Nhe)	İzolat	BCET-RPLA (Hbl) ^a	BDEVIA (Nhe)
N1	-	-	K3	-	-
N2	1:2	-	K4	1:4	-
N3	-	-	K5	1:4	-
N4	1:4	-	K6	-	-
N5	1:4	-	K7	-	-
N6	1:1	+	K8	1:4	-
N7	1:4	-	K9	-	-
N8	-	-	K10	-	-
N9	-	-	K11	1:2	-
N10	-	+	K12	1:4	-
N11	1:2	-	K13	1:4	-
N12	1:4	-	K14	1:2	-
N13	-	+	K16	1:4	-
N14	1:4	-	K17	-	-
N15	1:2	-	K18	1:4	-
N16	-	-	K19	1:8	-
N17	1:2	-	BK07	-	-
N19	-	-	<i>Bacillus subtilis</i> PY 22	-	-
N21	1:2	-	<i>Bacillus subtilis</i> RSK 244	-	-
N22	1:4	-	<i>Bacillus subtilis</i> RSK 246	-	+
K1	-	-	<i>Bacillus cereus</i> 2248	1:64	+
K2	1:4	-	<i>Bacillus cereus</i> 2455/2	-	+

^a: Çökme gözlenen en son kuyucuktaki seyreltme oranı verilmiştir. +: Muhtemel pozitif, -: Negatif

Beattie ve Williams [30] yaptıkları bir çalışmada bakteri supernatantlarını BDEVIA ve BCET-RPLA kitleri ile test etmiş; *B. thuringiensis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. lentus* ve *B. laterosporus/cereus*'un Nhe; *B. circulans*, *B. laterosporus/cereus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mycooides* ve *B. thuringiensis*'in Hbl enterotoksinini ürettiklerini belirlemiş, üretilen toksinlerin *B. cereus* toksinlerine benzer yapıda olduğunu savunmuşlardır. Phelps ve McKillip [31] *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. lentimorbis*, *B. pasteurii* ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* gibi türlerin, Rowan ve ark. [32] ise *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. circulans* ve *B. megaterium*'un toksin üretme kapasitelerinin olduğunu belirlemişlerdir.

B. cereus ile aynı sınıfta yer alan *B. thuringiensis* ile yapılan çalışmalarda organik sebzelerden izole edilen türlerin Hbl ve Nhe enterotoksinlerini üretebildiği [33], biyopestisit, gıda ve gıda kaynaklı salgınlardan elde edilen izolatların orta düzey enterotoksin üreticisi olduğu [34] tespit edilmiştir. İki adet *B. cereus* suşu ile ticari mikrobiyal pestisitlerden izole edilen altı adet *B. thuringiensis* suşunun NheA üretme ve ikiye katlanma sürelerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, 2 adet *B. thuringiensis* var. *kurstaki* izolatının diğer iki *B. thuringiensis* ve *B. cereus* izolatlarından daha fazla toksin üretebildiği ve ikiye katlanma sürelerinin *B. cereus*'a çok yakın olduğu, ancak diğer iki *B. thuringiensis* suşunun ikiye katlanma süresinin ise *B. cereus*'a göre daha uzun olduğu belirlenmiştir [35].

B. cereus dışındaki türlerin enterotoksin üretmelerine yönelik negatif bulguların olduğu çalışmalar da bulunmaktadır. Mbozo ve ark. [36] bir tür fermente gıda olan Ntoba Mbodi üretimi için tapyoka yapraklarının fermentasyonunda rol oynayan *Bacillus* türlerinin çeşitliliğini ve güvenilirliğini araştırdıkları bir çalışmada

baskın türün (%72.2) *B. pumilus* grubu (*B. safensis*, *B. pumilus*, *B. pumilus sensu lato*) olduğunu, diğer türlerin ise *B. cereus sensu lato*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis*, ve *B. licheniformis* olduğunu tespit etmiş, *B. cereus* dışındaki hiçbir türün toksin geni taşımadığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde, *B. amyloliquefaciens* [37], *B. subtilis* P223 [38], *B. subtilis* P229'un [39] enterotoksin üretmedikleri ve *B. toyonensis* BCT-7112'in [40] ise enterotoksin üretmediği veya *B. cereus*'a oranla çok az ürettiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir.

SONUÇ

Özellikle *B. subtilis* ve *B. licheniformis* gibi *Bacillus* türleri GRAS olarak bilindiklerinden birçok endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Toksin üretimi açısından *Bacillus cereus* üzerinde önemle durulurken, diğer türlerin de toksin üretebileceği üzerine çalışmalar yaklaşık son 15-20 yıldır yapılmaktadır. Gıda endüstrisi başta olmak üzere tüm endüstriyel uygulamalarda kullanılacak olan, özellikle de yeni izole edilmiş olan, *Bacillus* türlerinin toksin üretimi açısından kontrol edilmesi gerekmektedir. Yapılacak olan çalışmalarda toksin üretmeyen suşlar kullanılmalı ya da suşun toksini üretmediği kültür koşullarının tespit edilmesi gerekmektedir. Toksini elimine etmek açısından diğer bir yöntem ise moleküler biyoloji ve genetik teknikleri ile toksini üretmeyen rekombinant suşun elde edilmesidir.

Literatürdeki çalışmalarda, sünmüş ekmeğin tüketilmesi durumunda gıda zehirlenmesi vakalarının görülebileceğinden bahsedilmektedir. Ancak çalışmalarda, zehirlenmenin vücuda fazla miktarda bakteri sporu alındığı zaman ortaya çıkabileceğinden söz edilmiş olmasına rağmen, bu zehirlenmenin, söz

konusu sünme (rope) etmeni bakterilerin toksin üretiminden kaynaklandığını belirten literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu çalışma ile ekmeklerde sünme hastalığından sorumlu *Bacillus* türlerinin Hbl ve Nhe enterotoksinlerini üretme potansiyelinin olduğu tespit edilmiştir. Ancak enterotoksin üretimi açısından “muhtemel pozitif” olarak tespit edilen türlerle ilgili daha ileri analizlerin yapılarak, bu türlerin enterotoksin geni taşıyıp taşımadıklarının ya da enterotoksin üretilip üretilmediklerinin net olarak belirlenmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Koordinasyon Birimi tarafından 2010.03.0121.020 proje numarasıyla desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Schoeni, J.L., Wong, A.C.L. (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, 68(3), 636-648.
- [2] Salkinoja-Salonen, M.S., Vuorio, R., Andersson, M.A., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A.C. (1999). Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4637-4645.
- [3] Suominen, I., Andersson, M.A., Andersson, M.C., Hallaksela, A., Kämpfer, P., Rainey, F.A., Salkinoja-Salonen, M. (2001). Toxic *Bacillus pumilus* from indoor air, recycled paper pulp, Norway spruce, food poisoning outbreaks and clinical samples. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 267-276.
- [4] From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazábal, V., Granum, P.E. (2005). Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1178-1183.
- [5] Lindbäck, T., Granum, P.E. (2006). Detection and purification of *Bacillus cereus* enterotoxins. In Food Borne Pathogens: Methods and Protocols Edited by C.C. Adley, Humana Press, Totowa, 15-26p.
- [6] Granum, P.E., Brynestad, S., O'sullivan, K., Nissen, H. (1993). Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 47, 63-70.
- [7] Senesi, S., Ghelardi, E. (2010). Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 1690-1703.
- [8] Mckillip, J.L. (2000). Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77, 393-399.
- [9] Cai, Y., Huang, T., Xu, Y., Zhou, G., Zou, P., Zeng, G., Liu, X. (2017). Genetic and genomic diversity of NheABC locus from *Bacillus* strains. *Archives of Microbiology*, 199, 775-785.
- [10] Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y., Mori, M. (1995). The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiology*, 141, 938-988.
- [11] Choma, C., Granum, P.E. (2002). The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiology Letters*, 217(1), 115-119.
- [12] Hansen, B.M., Høiby, P.E., Jensen, G.B., Hendriksen, N.B. (2003). The *Bacillus cereus* bceT enterotoxin sequence reappraised. *FEMS Microbiology Letters*, 223, 21-24.
- [13] Asano, S.I., Nukumizu, Y., Bando, H., Iizuka, T., Yamamoto, T. (1997). Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 1054-1057.
- [14] Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S. (2004). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiology Letters*, 232, 189-195.
- [15] Kim, J.B., Kim, J.M., Kim, S.Y., Kim, J.H., Park, Y.B., Choi, N.J., Oh, D.H. (2010). Comparison of enterotoxin production and phenotypic characteristics between emetic and enterotoxic *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 73(7), 1219-1224.
- [16] Granum, P.E., Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157, 223-228.
- [17] Mikkola, R., Saris, N.E.L., Grigoriev, P.A., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S. (1999). Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide. *European Journal of Biochemistry*, 263, 112-117.
- [18] Collins, N.E., Kirschner, L.A.M., von Holy, A. (1991). Characterization of *Bacillus* isolates from ropey bread, bakery equipment and raw materials. *South African Journal of Science*, 87, 62-66.
- [19] Kirschner, L.A.M., von Holy, A. (1989). Rope spoilage of bread. *South African Journal of Science*, 85, 425-427.
- [20] Thompson, J.M., Dodd, C.E.R., Waites, W.M. (1993). Spoilage of bread by *Bacillus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 32(1-3), 55-66.
- [21] Thompson, J.M., Waites, W.M., Dodd, C.E.R. (1998). Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 481-486.
- [22] Volavsek, P.J.A., Kirschner, L.A.M., von Holy, A. (1992). Accelerated methods to predict the rope-inducing potential of bread raw materials. *South African Journal of Science*, 88, 99-102.
- [23] Erem, F., Certel, M., Karakaş, B. (2009). Identification of *Bacillus* species isolated from ropey breads both with classical methods and API identification kits. *Journal of The Faculty of Agriculture Akdeniz University*, 22(2), 201-210.
- [24] Smith, J.P., Dafias, D.P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., El-Khoury, A. (2004). Shelf life and safety concerns of bakery products – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 19-55.
- [25] Karakaş, B. (2009). *Bacillus subtilis*'den α -amilaz geninin klonlanması ve *Pichia pastoris* mayasında ekspresyonu. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, 140 ss.

- [26] Anonymous. (2011). BCET-RPLA Enterotoxin Kit Manufacturer's Instruction.
- [27] Anonymous. (2011). BDEVIA Enterotoxin Kit Manufacturer's Instruction.
- [28] Ehling-Schulz, M. (2005). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151, 183-197.
- [29] Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M., Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 260, 232-240.
- [30] Beattie, S.H., Williams, A.G. (1999). Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 221-225.
- [31] Phelps, R.J., Mckillip, J.L. (2002). Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 3147-3151.
- [32] Rowan, N.J., Deans, K., Anderson, J.G., Gemmell, C.G., Hunter, I.S., Chaithong, T. (2001). Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3873-3881.
- [33] Kim, J.B., Choi, O.K., Kwon, S.M., Cho, S.H., Park, B.J., Jin, N.Y., Yu, Y.M., Oh, D.H. (2017). Prevalence and toxin characteristics of *Bacillus thuringiensis* isolated from organic vegetables. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1449-1456.
- [34] Jöhler, S., Kalbhenn, E.M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bağcıoğlu, M., Contzen, M., Stephan, R., Ehling-Schulz, M. (2018). Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-11.
- [35] Choi, H.J., Kang, S.J., Hong, K.W. (2017). Comparison of NheA toxin production and doubling time between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied Biological Chemistry*, 60(5), 545-551.
- [36] Mbozo, A.B.V., Kobawila, S.C., Anyogu, A., Awamaria, B., Louembe, D., Sutherlenad, J.P., Ouoba, L.I.I. (2017). Investigation of the diversity and safety of the predominant *Bacillus pumilus* sensu lato and other *Bacillus* species involved in the alkaline fermentation of cassava leaves for the production of Ntoba Mbodi. *Food Control*, 82, 154-162.
- [37] Lee, A., Cheng, K.C., Liu, J.R. (2017). Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential. *Plos One*, 12(8), e182220.
- [38] Jeon, H.L., Lee, N.K., Yang, S.J., Kim, W.S., Paik, H.D. (2017). Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 26(6), 1641-1648.
- [39] Jeon, H.L., Yang, S.J., Son, S.H., Kim, W.S., Lee, N.K., Paik, H.D. (2018). Evaluation of probiotic *Bacillus subtilis* P229 isolated from cheonggukjang and its application in soybean fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 97, 94-99.
- [40] Abdulmawjood, A., Herrmann, J., Riede, S., Jimenez, G., Becker, A., Breves, G. (2019). Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT-7112. *Plos One*, 14(4), e0214536.