

ÇİĞ SÜT, PASTÖRİZE SÜT VE BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN VE İDOMETRİK TEST YÖNTEMİYLE BETA-LAKTAMAZ VARLIĞI SAPTANAN *BACILLUS* TÜRLERİ

THE ISOLATION OF *BACILLUS* SPECIES FROM THE SAMPLES OF RAW MILK, PASTEURIZED MILK AND WHITE CHEESE AND THE DETERMINATION OF *BACILLUS* SPECIES BEING EXISTENCE BETA-LACTAMASE BY IODOMETRIC TEST METHOD

Güven URAZ¹, Seza ARSLAN², Neslihan GÜNDOĞAN³

¹⁻³ Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

² Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji

ÖZET: Çeşitli süt işletmelerinden sağlanan süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden toplam 72 *Bacillus* izole edilmiştir. 30'u beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilmiştir. Beta-laktamaz pozitif olarak değerlendirilen *Bacillus*'ların 4'ü çiğ süttten, 8'i pastörize süttten, 18'i de beyaz peynir örneklerinden saptanmıştır.

30 beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'ların 3'ü *B. cereus*, 1'i *B. lentus*, 1'i *B. brevis*, 2'si *B. firmus*, 1'i *B. thuringiensis*, 1'i *B. polymyxa*, 1'i *B. circulans* 1'i *B. pumilus*, 2'si *B. megaterium* ve 17'si adlandırılmayan *Bacillus*'lardır.

Beta-laktamaz negatif olarak değerlendirilen 42 *Bacillus*'un 2'si çiğ süt, 24'ü pastörize süt ve 16'sı da peynir örneklerinden izole edilmiştir.

42 beta-laktamaz negatif *Bacillus*'ların, 5'i *B. sphaericus*, 1'i *B. firmus*, 1'i *B. circulans*, 1'i *B. anthracis*, 1'i *B. pumilus*, 1'si *B. macerans* ve 32'si adlandırılmayan *Bacillus*'lardır.

Beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilen *Bacillus*'lar daha sonra penisilin-G antibiyotiği ile kontrol edilmiştir. Ayrıca sefazolin, klavulanat-amoksisilin, gentamisin, amikasin, klindamisin ve ofloksasin antibiyotiklerine karşı antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır.

SUMMARY: Totally 72 *Bacillus* was isolated from the samples of raw milk, pasteurized milk and white cheese which were obtained from various milk companies. 30 *Bacillus* were determined to have positive beta-lactamase. The positive beta-lactamase *Bacillus* were found 4 from raw milk, 8 from pasteurized milk and 18 from white cheese.

30 beta-lactamase positive *Bacillus* were called 3 *B. cereus*, 1 *B. lentus*, 1 *B. brevis*, 2 *B. firmus*, 1 *B. thuringiensis*, 1 *B. polymyxa*, 1 *B. circulans* 1 *B. pumilus*, 2 *B. megaterium* and 17 as a unknown *Bacillus*. Beta-lactamase negative 42 *Bacillus* were isolated 2 from raw milk, 24 from pasteurized milk and 16 from white cheese.

42 beta-lactamase negative *Bacillus* are named 5 *B. sphaericus*, 1 *B. firmus*, 1 *B. circulans*, 1 *B. anthracis*, 1 *B. pumilus*, 1 *B. macerans* and 32 as a unknown.

The *Bacillus* which were tested as beta-lactamase positive were then controlled by penicillin-G antibiotics. In addition, the antibiotic sensitivity tests against cefazolin, amoxicillin-clavulanic acid, gentamicin, amikacin, clindamycin and ofloxacin were also tested.

GİRİŞ

Beta-laktamaz enzimi; gram pozitif ve gram negatif bakterilerin bazıları tarafından sentezlenir. Bu bakterilerden *Bacillus* türleri önemli beta-laktamaz sentezleyicisi olarak son yıllarda yapılan araştırmalarda belirtilmiştir.

Beta-laktamaz genellikle beta-laktam antibiyotiklerini inhibe eden bir enzimdir. Bu tür enzim bulunduran bakteriler süt aracılığıyla insan organizmasına geçebilir. Bu düşünceden hareket edilerek çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynirden izole edilen *Bacillus* türlerinde beta-laktamaz araştırması gerçekleştirilmiştir.

Beta-laktamaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan İdometrik Test yöntemi beta-laktamaz enziminin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir ve İdometrik Testte substrat olarak, penisilin-G antibiyotiği kullanılmaktadır (WASHINGTON, 1985).

NAKAMURA ve arkadaşları (1991) *Bacillus subtilis*'in mutantlarıyla yaptıkları çalışmalarda beta-laktamaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde İdometrik Test metodunu kullanmışlardır.

Literatürde *Bacillus* türleriyle yapılmış birçok beta-laktamaz çalışmasına rastlanmıştır.

NAKAMURA ve arkadaşları (1989) *B. subtilis* ve *E.coli* hücrelerinde salgı yapan proteinlerin sentezi üzerine yaptıkları çalışmada nitrosefin substratını spektrofotometrik olarak beta-laktamaz tayininde kullanmışlardır.

HEMILA ve SIBAKOV(1991) *B. subtilis*'in heterolog proteinleriyle ilgili çalışmalarında beta-laktamaz aktivitesinin tayininde substrat olarak nitrosefinin kullanıldığı spektrofotometrik yöntemi tercih etmişlerdir.

Bu yapılan çalışmalardan da yararlanarak çiğ süt ve ürünlerinden izole edilen *Bacillus* türlerinde beta-laktamaz araştırması gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çeşitli süt işletmelerinden alınan çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden 72 *Bacillus* izole edilmiştir. Daha sonra İodometrik Test yöntemiyle 72 *Bacillus*'un 30'u beta-laktamaz pozitif ve 42'si beta-laktamaz negatif olarak bulunmuştur.

Araştırmada Türk Standartları Enstitüsünde (TSE-1018) belirtilen esaslara göre çiğ ve pastörize süt örnekleri steril 200 ml'lik şişelerde alınmıştır (ANONYMOUS, 1981). Çiğ süt örneklerinde 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 'lük dilüsyonlar hazırlanarak 10^{-3} dilüsyondan 0,1 ml. PCA ve glukoz agar besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyona bırakılmıştır. Pastörize sütler iki gruba ayrılmış, birincisi çevre sıcaklığı olan $+22^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiştir. Pastörize sütlerden ikincisi ise buzdolabı sıcaklığında yani $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat beklemeye bırakılmıştır. Daha sonra her iki gruptan da 0,1 ml. alınarak ayrı ayrı PCA ve glukoz agar besiyerine ekilmiş ve inkübasyona konmuştur.

Beyaz peynir örnekleri steril cam kavanozlarla laboratuvara getirilmiştir. Steril bıçakla kesilen 10 gr. beyaz peynir örneği steril porselen havanda sıcaklığı 45°C olan 90 ml. trisodyum sitrat ile iyice ezilmiştir. Burdan 10^{-1} dilüsyonlu beyaz peynir örneği hazırlanmıştır.

Beyaz peynir örneklerinden de 10^{-1} dilüsyon hazırlanarak 0,1 ml. PCA ve glukoz agar besiyerine ekim yapılmış ve inkübasyona bırakılmıştır.

PCA ve glukoz agar plaklarında üreyen *Bacillus* kolonileri daha sonra biyosimik testlere alınmıştır ve adlandırılmıştır. *Bacillus* adlandırılmalarında karbonhidratları kullanma (OF), glukozdan gaz, glikoz, ksiloz, mannitol, laktoz, sükröz, maltoz fermentasyonu, hareket (SIM), % 65 NaCl'de üreme, nitrat redüksiyonu, indol, triple sugar iron (TSI), Voges proskauer (VP), gelatin ve esculin testlerinden faydalanılmıştır (KONEMAN, 1988). Bu testler sonucunda çalışmamızda *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. brevis*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. circulans*, *B. anthracis*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* türleri tespit edilmiştir.

Testler sonucunda adlandırılan *Bacillus* türleri saf kültür olarak % 0,2 çözünebilir nişasta içeren Nutrient agar besiyerinde yeniden üretilmişlerdir. Üreyen koloniler üzerine iodometrik test çözeltisi damlatılmıştır. Çözeltinin damlatılmasından hemen sonra iyot, nişastaya bağlandığı için kolonilerin çevresinde mavi renk oluşmuştur. Daha sonra kısa bir süre içinde mavi renk koloniden çevreye doğru genişleyen halkalar halinde kaybolmuştur. Beta-laktamaz üretmeyen kolonilerin çevresi ise renksiz kalmıştır (WASHINGTON, 1985).

Beta laktamaz enzim araştırmalarında antibiyotik hassasiyet testleri ile sonuçlar desteklenmektedir. Bu düşünceden hareket ederek İodometrik Test yöntemiye beta-laktamaz pozitif bulunan *Bacillus*'lar penisilin-G ile antibiyogram yapılarak kontrol edilmiştir. Ayrıca sefazolin, klavulanat-amoksisilin, gentamisin, amikasin, klindamisin ve ofloksasin antibiyotikleriyle de duyarlılık testleri yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde Müeller-Hinton besiyeri kullanılmış ve Kirby-Bauer metodu kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir (BAUER, 1970).

ARAŞTIRMA BULGULARI

Çeşitli süt işletmelerinden sağlanan örneklerden toplam 72 *Bacillus* izole edilmiştir. İodometrik Test yöntemiyle 30'u beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilmiştir. Beta-laktamaz pozitif olarak değerlendirilen *Bacillus*'ların 4'ü çiğ süttten, 8'i pastörize süttten, 18'i beyaz peynir örneklerinden saptanmıştır.

Çizelge 1. Çiğ Süt, Pasterize Süt ve Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Toplam 72 *Bacillus*'un Adlandırılmasında Kullanılan Testler ve Dağılımı

Çiğ süt, pasterize süt ve beyaz peynir renklerinde üreyen <i>Bacillus</i> türleri	<i>Bacillus</i> türlerinin adlandırılmasında kullanılan testler																	Toplam	
	OF	Glu gaz	Glu	Ksi	Man	Lak	Sük	Mal	SIM	%6,5 NaCl	Nit	İn	TSI		VP	Gel	Esc		
													Y D	H ₂ S Dip					
<i>B. macerans</i>	F	-	-	V	-	-	-	+	V	-	+	-	-	A/A	-	-	+	-	1
<i>B. megaterium</i>	F	-	-	V	-	V	-	V	V	-	-	-	-	V/V	-	-	+	V	2
<i>B. sphaericus</i>	OF	-	-	-	-	-	-	-	+	V	V	-	-	Alk/Alk	-	-	-	-	5
<i>B. cereus</i>	F	-	-	-	-	-	V	+	+	V	V	-	-	V/A	-	-	-	V	3
<i>B. brevis</i>	OF	-	V	-	-	-	V	V	+	V	V	-	-	Alk/Alk	-	-	V	V	1
<i>B. lentus</i>	F	-	W	-	W	W	W	W	+	-	-	-	-	A/A	-	-	-	-	1
<i>B. firmus</i>	F	-	-	V	-	V	-	+	+	V	V	-	-	V/V	-	-	V	V	3
<i>B. circulans</i>	F	-	-	-	-	-	-	+	+	V	V	-	-	A/A	-	-	-	-	2
<i>B. anthracis</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V/A	-	-	+	V	1
<i>B. polymyxa</i>	F	-	-	-	V	-	-	+	+	V	+	-	-	A/A	-	-	+	-	1
<i>B. pumilus</i>	F	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	V/V	-	-	+	+	2
<i>B. thuringiensis</i>	F	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	A/A	-	-	+	-	1
Adlandırılmayan <i>Bacillus</i> 'lar																			49

Çizelgedeki kısaltmalar: OF: Karbonhidratları kullanma; Glu gaz: Glukozdan gaz; Glu: Glukoz; Ksi: Ksiloz; Man: Mannitol; Lak: Laktöz; Sük: Sükröz; Mal: Maltoz; SIM: Hareket; Nit: Nitrat; İn: İndol; TSI-Y: TSI Yaılı; TSI-D: TSI Dp; VP: Voges proskauer; Gel: Gelatin; Esc: Eszulin (O: Ossidatif; F: Fermentatif; V: Değişken; W: Geç pozitif; A: Asit; Alk: Alkali)

30 beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'un 3'ü *B.cereus*, 1'i *B. lentus*, 1'i *B. brevis*, 2'si *B. firmus*, 1'i *B. thuringiensis*, 1'i *B. polymyxa* 1'i *B. circulans* 1'i *B. pumilus*, 2'si *B. megaterium* ve 17'si adlandırılmayan *Bacillus*'lardır. 2'si çiğ süt, 24'ü pastörize süt ve 16'sı da beyaz peynir örneklerinden izole edilmiştir.

42 beta-laktamaz negatif *Bacillus*'ların, 5'i *B. sphaericus*, 1'i *B. firmus* 1'i *B. circulans*, 1'i *B. anthracis*, 1'i *B. pumilus*, 1'i *B. macerans* ve 32'si adlandırılmayan *Bacillus*'lardır.

Beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilen *Bacillus*'lar daha sonra penisilin-G antibiyotigi ile test edilerek beta-laktamaz pozitiflikleri kontrol edilmiştir. Ayrıca sefazolin, klavulanat-amoksisilin, gentamisin, amikasin, klindamisin ve ofloksasin antibiyotiklerine karşı antibiyotik duyarlık testleri yapılmıştır. Beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'ların antibiyotiklere çok yönlü direnç gösterdiği görülmüştür.

Çizelge 2. Çiğ Süt, Pastörize Süt ve Beyaz Peynir Örneklerinde İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enzim Varlığı Pozitif Olan 30 *Bacillus*'un Dağılımı

Çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynirde üreyen beta-laktamaz pozitif <i>Bacillus</i> 'lar	Çiğ süttten izole edilen beta-laktamaz pozitif <i>Bacillus</i> sayısı	Pastörize süttten izole edilen beta-laktamaz pozitif <i>Bacillus</i> sayısı		Beyaz peynirde izole edilen beta-laktamaz pozitif <i>Bacillus</i> sayısı	Toplam
		+22°C'de	+4°C'de		
<i>B.lentus</i>	-	-	-	1	1
<i>B.brevis</i>	-	-	-	1	1
<i>B.firmus</i>	-	-	-	2	2
<i>B.thuringiensis</i>	-	-	-	1	1
<i>B.pumilus</i>	-	-	-	1	1
<i>B.megaterium</i>	-	-	-	2	2
<i>B.polymyxa</i>	-	-	-	1	1
<i>B.circulans</i>	-	-	-	1	1
<i>B.cereus</i>	-	-	-	3	3
Adlandırılmayan <i>Bacillus</i> 'lar	4	4	4	5	17
Toplam	4	4	4	18	30

Not: Toplam 30 *Bacillus* izolasyonununun 13'ü (% 43,33) adlandırılmış *Bacillus* türleridir. Geriye kalan 17'si (% 56,67) adlandırılmayan *Bacillus*'ları ihtiva eder.

Çizelge 3. Çiğ Süt, Pastörize Süt ve Beyaz Peynir Örneklerinde İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enzim Varlığı Negatif olan 42 *Bacillus*'un Dağılımı

Çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynirde üreyen beta-laktamaz negatif <i>Bacillus</i> 'lar	Çiğ süttten izole edilen beta-laktamaz negatif <i>Bacillus</i> sayısı	Pastörize süttten izole edilen beta-laktamaz negatif <i>Bacillus</i> sayısı		Beyaz peynirde izole edilen beta-laktamaz negatif <i>Bacillus</i> sayısı	Toplam
		+22°C'de	+4°C'de		
<i>B.firmus</i>	-	-	-	1	1
<i>B.anthraxis</i>	-	-	-	1	1
<i>B.macerans</i>	-	-	-	1	1
<i>B.circulans</i>	-	-	-	1	1
<i>B.pumilus</i>	-	-	-	1	1
<i>B.sphaericus</i>	-	-	-	5	5
Adlandırılmayan <i>Bacillus</i> 'lar	2	13	11	6	32
Toplam	2	13	11	16	42

Not: Toplam 42 *Bacillus* izolasyonununun 10'u (% 23,81) adlandırılmış *Bacillus* türleridir. Geriye kalan 32'si (% 76,19) adlandırılmayan *Bacillus*'ları ihtiva eder.

Çizelge 2'de 30 beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'ların 13'ü (% 43,33) adlandırılmış *Bacillus* türleridir. Bunların 3'ü *B.cereus*, 1'i *B.lentus*, 1'i *B.brevis*, 2'si *B.firmus*, 1'i *B.thuringiensis*, 1'i *B.pumilus*, 2'si *B.megaterium*, 1'i *B.polymyxa*, 1'i *B.circulans* ve 17'si (% 56,67) adlandırılmayan *Bacillus*'lardır. Beta-laktamaz negatif olarak değerlendirilen 42 (% 58,33) *Bacillus*'un 2'si çiğ süt, 24'ü pastörize süt ve 16'sı da beyaz peynir örneklerinden izole edilmiştir.

Çizelge 3'de 42 beta-laktamaz negatif *Bacillus*'ların; 10'u (% 23,81) adlandırılmış *Bacillus* türleridir. Bunların 5'i (% 11,90) *B.sphaericus*, 1'i *B.firmus*, 1'i *B.circulans*, 1'i *B.anthraxis*, 1'i *B.pumilus*, 1'i *B.macerans* ve 32'si (% 76,19) adlandırılmayan *Bacillus*'lardır.

Çizelge 4. İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enzimi Pozitif Olarak Değerlendirilen 30 *Bacillus* Türlerine Ait Antibiyogram Sonuçları

Test Edilen Antibiyotikler	Beta-laktamaz pozitif <i>Bacillus</i> bakterilerinin antibiyogram sonuçları		
	Hassas	Orta	Dirençli
Ofloksasin	8	2	20
Klavulanat Amoksisilin	2	8	20
Klindamisin	-	1	29
Amikasin	1	7	22
Sefazolin	-	3	27
Gentamisin	2	2	26
Penisilin-G	-	-	30

Şekil 1'de beta-laktamaz enzimi pozitif 30 *Bacillus*'un antibiyogram sonuçları görülmektedir. Bu beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'ların hepsi penisilin-G'ye % 100 direnç göstermişlerdir.

Bacillus'ların 29'u (% 97) klindamisin'e, 27'si (% 90) sefazolin'e ve 26'sı da (% 86) gentamisin'e dirençli tespit edilmiştir. 22 (% 73) beta-laktamaz pozitif *Bacillus* amikasin'e dirençli bulunmuştur. En az dirençli olan antibiyotikler ofloksasin ve klavulanat-amoksisilindir. Bunlar 30 *Bacillus*'un 20'sinde (% 67) dirençli tespit edilmişlerdir.

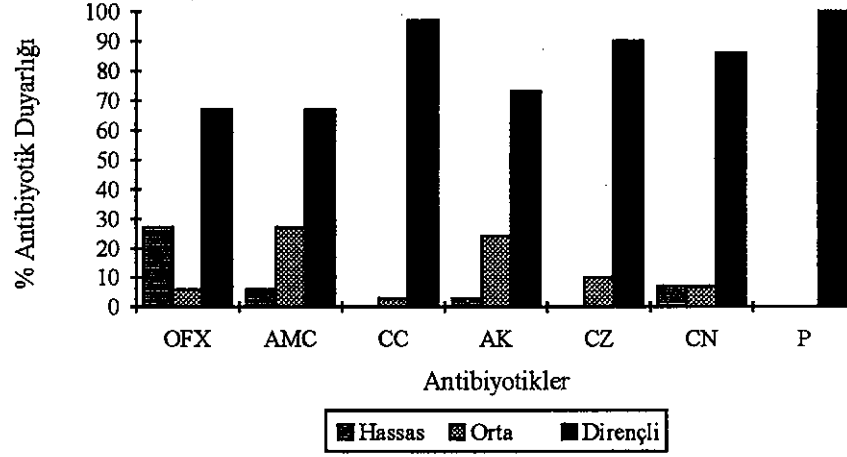
TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan araştırmalarda sütlerde beta-laktamaz sentezleyen bakterilerin varlığından bahsedilmektedir.

CHAND ve arkadaşları (1990) süttten izole ettikleri *Bacillus* türlerinin beta-laktamaz aktivitesini çalışmışlardır. Sonuç olarak *Bacillus* türlerinin sütteki en önemli beta-laktamaz sentezleyicisi olduğunu belirtmişlerdir. Bizim araştırmamız sonuçlarına göre de beta-laktamaz pozitif *Bacillus* türleri süt ve süt ürünlerinden izole edilen beta-laktamaz pozitif bakteri türleri arasındadır. Bulgularımız incelendiğinde beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'lardan 3 (% 10) *Bacillus cereus* izole edilmiştir. Bu da besin zehirlenmesine sebep olan *Bacillus* türü olması nedeniyle önemlidir. Her üç izolasyonda beyaz peynir örneklerinden izole edilmiştir. Ayrıca *B. anthracis Bacillus* izolasyonları arasında yer almıştır. Beta-laktamaz negatif ve beyaz peynir örneklerinden saptanmıştır.

Beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'ların 4'ü çiğ süten 8'i pastörize süttten 18'i de beyaz peynir örneklerinden saptanmıştır. Bu sonuçlar beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'ların önemini vurgulamaktadır. Aynı zamanda *Bacillus* türü bakterilerin sporlarının ısıya dayanıklı olduğu da hatırlanmalıdır.

Yapılan pastörizasyon işlemi yeterli olmadığında *Bacillus* sporlarının zamanla aktivite kazanabileceği düşünülmelidir. Ayrıca sterilizasyonu iyi gerçekleştirilmemiş şişelerde de pastörize sütlere *Bacillus* bakterilerinin bulaşabileceği gözönünde tutulmalıdır. Bu nedenle araştırmada pastörize sütlere çiğ sütlere oranla *Bacillus*'lar daha fazla tespit edilmiştir.



Not: 30 *Bacillus* dikkate alınarak yüzdeler hesaplanmıştır.

Şekil 1. Çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden izole edilen beta-laktamaz pozitif 30 *Bacillus*'un antibiyogram sonuçları

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 1981. Türk Standartları Enstitüsü, Çiğ Süt TS 1018.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., TRUCK, M., 1970. Antibiotic susceptibility testing a standardized single disk method, Am. J. Clin. Path. 45(4) 493.
- CHAND, R., AGGARWAL, P.K., 1990. Penicillinase producing *Bacillus* species in milk. Brief Communications of the XXIII international Dairy Congress, Montreal, October, 8-12.
- HEMILA, H., SIBAKOV, M., 1991. Production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* the effect of the joint between signal sequence and mature protein on yield. Appl. Microbiol. Biotechnol, 36: 61-64.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DOWELL, V.R., et. al., 1988. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 3rd Edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 840 sayfa.
- NAKAMURA, A., TOYAMA, N. et. al., 1991. Use of a Triple Protease-deficient Mutant of *Bacillus subtilis* as a Host for secretion of a *B. subtilis* Cellulase and TEM β -Lactamase. Agric. Biol. Chem., 55(9) 2367-2374.
- NAKAMURA, K., FUJITA, Y. et. al., 1989. Modification of length, hydrophobic properties and electric charge of *Bacillus subtilis* α -amylase and signal peptide and their different on the production of secretory proteins in *B. subtilis* and *E.coli* cells. Mol. Gen. Genet., 216 1-9.
- WASHINGTON, J.A., 1985. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, 2nd edition United States of America, 885 sayfa.