

33 *BACILLUS* İZOLATINDA KROMOJENİK SEFALOSPORİN TEST (NİTROSEFİN) YÖNTEMİYLE BETA-LAKTAMAZ ENZİM ARAŞTIRMASI VE BETA-LAKTAMAZ POZİTİF İZOLATLARIN AMPİSİLİN VE İMİPENEM'E KARŞI HASSASİYETLERİ

BETA-LACTAMASE ENZYME RESEARCH BY USING CHROMOGENIC CEPHALOSPORINE TEST (NITROCEFİN) IN 33 *BACILLUS* ISOLATES AND THE SENSITIVITY TESTS OF BETALACTAMASE POSITIVE ISOLATES AGAINST AMPICILIN AND IMPENEMS

Güven URAZ¹, Mine KAAOĞLU²

¹Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, ANKARA

²Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET: Çeşitli yörelerden sağlanan 195 çiğ süt örneğinden toplam 33 *Bacillus* (%16.9) izole edilmiştir. Bu izole edilen *Bacillus*'lar çeşitli biyoşimik testlerle 13 farklı *Bacillus* türü olarak adlandırılmıştır. Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Bacillus* türleri içinde en yaygın olarak görülen türler 3 *B. brevis* (%9), 3 *B. cereus* (%9), 3 *B. licheniformis*(%9), 3 *B. mycooides*(%9), 3 *B. sphaericus*(%9), 3 *B. stearothermophilus*(%9) ve 3 *B. subtilis* (%9) türleri olup, *B. megaterium*(%3) türünün izolasyonu ise düşük oranlarda gerçekleştirilmiştir. Afyon(4), Ankara(9), Antalya(3), Burdur(11), Denizli(1) ve Nevşehir(5) bölgelerinden gelen çiğ süt örneklerinden izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. En fazla *Bacillus* izolasyonu Burdur(11)'den gelen çiğ süt örneklerinden sağlanmıştır. İkinci sıklıkta *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilen çiğ sütler, Ankara(9) bölgesinden gelen çiğ sütlerdir. En az *Bacillus* izolasyonu Denizli (1)'den gelen çiğ sütlerden elde edilmiştir. Araştırmada izole edilen *Bacillus* türlerinin beta-laktamaz enzim aktiviteleri Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrocefın) yöntemi ile çalışılarak değerlendirilmiştir. Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrocefın) yöntemi ile beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilen *Bacillus*'lar daha sonra penisilin-G antibiyotigi ile kontrol edilmiştir. Toplam 33 *Bacillus*'un 10'unda (%30) beta-laktamaz enzim aktivitesi pozitif olarak tespit edilmiştir. Beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'ların 2'si *B. lantus* (%6), 1'i *B. megaterium*(%3), 2'si *B. brevis*(%6), 2'si *B. mycooides* (%6) ve 3'ü de *B. polymxa* (%9)'dur. Geriye kalan 23 *Bacillus* (%70) izolatının beta-laktamaz enzim varlığı negatif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca beta-laktamaz pozitif ve negatif *Bacillus* izolatlarının ampisilin ve imipenem antibiyotiklerine karşı duyarlılık testleri de yapılmıştır. Beta-laktamaz enzim aktivitesi pozitif olarak değerlendirilen *Bacillus* türlerinin impenem antibiyotigine karşı %100 hassasiyet ve ampisilin antibiyotigine karşı ise %100 dirençlilik gösterdikleri tespit edilmiştir.

ABSTRACT: Totally 33 *bacillus* strains (%16.9) from 195 raw milk samples provided various regions. Widespread species within the *bacillus* strains isolated from raw milks were 3 *B. brevis*(%9), 3 *B. cereus*(%9), 3 *B. licheniformis*(%9), 3 *B. mycooides*(%9), 3 *B. sphaericus*(%9), 3 *B. stearothermophilus*(%9) and 3 *B. subtilis*(%9). But the isolation of *B. megaterium* (%3) was found too low. The isolates from Afyon(4), Ankara(9), Antalya(3), Burdur(11), Denizli(1) and Nevşehir(5) were obtained. The most *Bacillus* strains were isolated from the raw milk samples gathered from Burdur (11). Second one were isolated from Ankara (9). The less one were isolated from Denizli(1). In this research, beta-lactamase enzyme activities of *Bacillus* species isolated were evaluated by using Chromogenic Cephalosporin (Nitrocefın) Test. Besides beta-lactamase positive *Bacillus* strains were controlled with Peniciline-G antibiotic. 10 *Bacillus* strains of totally 33 ones were determined as a positive beta-lactamase enzyme activity. Furthermore, the two ones of beta-lactamase positive *Bacillus* strains were *B. lantus* (%6), one was *B. megaterium* (%3), two were *B. brevis* (%6), two were *B. mycooides* (%6) and three ones were *B. polymxa* (%9). Presence of beta-lactamase enzyme of the rest of 23 *Bacillus* isolates (%70) were determined as a negative. Also beta,lactamase positive and negative *Bacillus* isolates were tested to be sensitive against ampicillin and imipenem antibiotics. Beta-lactamase positive *Bacillus* species were determined as a %100 sensitive against imipenem antibiotic and were determined as a %100 resistant against to ampicillin antibiotic.

GİRİŞ

Son yıllardaki literatürlerde *Bacillus* türlerinin izolasyonları ve beta-laktamaz enzimleri ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Çiğ sütler, tüketiciye ulaşana kadar geçen işlemler sırasında *Bacillus*'lar ve sporlarıyla kontamine olabilmektedirler. *Bacillus*'ların sporları yüksek sıcaklık derecelerine dayanıklı olduğu için pastörizasyon sonrası da sporlar yeniden aktivite kazanarak sütün bozulmasına sebep olabilirler. Bu yüzden başarısız

pastörizasyonlar sonucunda yeniden üreyebilirler. Ayrıca sütün işlenmesi sırasında çeşitli şekillerde de bulaşabilirler. Beta-laktamaz enzimlerini bulunduran *Bacillus*lar süt aracılığıyla insan organizmasına geçebilirler ve *Bacillus*lar çeşitli antibiyotiklere karşı direnç kazanabilirler. Bu nedenle süt ve süt ürünleri içerdikleri *Bacillus*lar ve enzimleri açısından halk sağlığını tehdit edebilirler. Sütte bulunan *Bacillus*ların bazıları patojen değildir. Ancak bazı türleri de insanda çeşitli enfeksiyonlara sebep olurlar. *B. alvei*, *B. anthracis*, *B.brevis*, *B.cereus*, *B.circulans*, *B.coagulans*, *B.licheniformis*, *B.macerans*, *B.pumilis*, *B.sphaericus*, *B.subtilis*, *B.thuringiensis* patojen türleri arasındadır (PETER ET.AL., 1995). *B.anthraxis*, insanda Şarbon (Anthrax) hastalığına sebep olur. *B.cereus* besin zehirlenmelerine yol açar. Ayrıca menenjit, bakteriyemi ve pnömoni gibi hastalıkların da etkenidir. *B.subtilis* saprofit olarak tanımlanan *Bacillus* türüdür. Ancak direk göze bulaşması sonucunda göz enfeksiyonlarına sebep olur. Ayrıca son yıllarda besin zehirlenmelerine de yol açtığı literatürlerde belirtilmiştir. *B.licheniformis*, *B.brevis*, *B. megaterium* türleri de diyare ve kuma şeklinde besin zehirlenmesine sebep olabilirler.

Gram(+), sporlu ve bazıları da patojen olan *Bacillus*lar kolaylıkla sütlere bulaşır ve salgıladıkları beta-laktamaz enzimleri ile daha da önemil olurlar (JACKSON, 1990).

Beta-laktamaz enzimi *Bacillus*ların sentezlediği enzimlerden biris olup, sentezlendiği bakteriye antibiyotiklere karşı direnç kazandırması yanında, sütlere ekşime ve tat bozukluklarına da sebep olur (Madgwick and Waley, 1987). Bu düşünceden hareket edilerek çiğ sütlere izole edilen *Bacillus* türlerinde beta-laktamaz enzim aktivitesi araştırılmıştır.

Chand ve arkadaşları 1990 yılında süttten izole ettikleri *Bacillus* türlerinin penisilnaz (Beta-laktamaz) enzim aktivitesini çalışmışlardır. Sonuçta *Bacillus* türlerinin sütlere en önemli beta-laktamaz sentezleyicisi olduğunu belirtmişlerdir.

Beta-laktamaz enzim aktivitesinin araştırılmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden Kromojenik Sefalosporin (Nitrosefin) Test yönetimi beta-laktamaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

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

HEMİLA ve SİBAKOV (1991) *B.subtilis*'in heterolog proteinleriyle ilgili çalışmalarında beta-laktamaz enzim aktivitesinin tayininde substrat olarak nitrosefin kullanmışlardır.

Bu çalışmalardan yola çıkarak çiğ sütlere izolasyonunu gerçekleştirdiğimiz *Bacillus* türlerinde beta-laktamaz enzim araştırması yapılmıştır. Beta-laktamaz pozitif ve negatif olarak belirlediğimiz *Bacillus* izolatlarının ampisilin ve imipenem antibiyotiklerine karşı hassasiyet testleri de çalışılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada, Afyon, Antalya, Ankara, Bilecek, Burdur, Denizli, Konya, Kütahya, Nevşehir ve Bilecik gibi çeşitli yörelerden çeşitli süt işletmelerine gelen 195 çiğ süt örneği alınarak çalışılmıştır.

Bacillus suşlarının izolasyonu amacıyla çiğ süt örnekleri Türk Standartları Enstitüsünde (TSE 1018) belirtilen esaslara göre steril 200 ml'lik şişelerde alınmıştır (ANONYMOUS, 1981). Bu çiğ süt örneklerinin %0.1'lik Peptone Water'le sulandırılması yapılarak 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 'e kadar dilisyonları hazırlanmıştır. Daha sonra 10^{-3} dilisyonundan 0,1 ml PCA ve Glukoz Agar besiyerine ekim yapılmıştır (Harmon et.al., 1993). Araştırmada, *Bacillus* türlerinin çiğ sütlere izolasyonu için PCA (Plate Count Agar) ve Glukoz Agar besiyerleri kullanılmıştır (Laberau and Mair, 1968). Bu plaklarda üreyen *Bacillus* kolonileri yeniden Glukoz Agara alınarak saflaştırılmış ve daha sonra biyoşimik testleri yapılmıştır *Bacillus*ların adlandırılmasında çeşitli biyokim yasal testlerden yararlanılmıştır. Katalaz reaksiyonu, hareket (SIM), gelatin, triple sugar iron (TSI), sitrat, üre, indol teşekkülü, voges proskauer (VP), %6.5 NaCl'de üreme, nitrat redüksiyonu, kanlı agarda hemoliz oluşturma testleri yapılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Araştırmada Kullanılan *Bacillus* Türlerinin Biyokimyasal Reaksiyonları

Bacillus türleri	Katalaz Üretimi	Jelatin Hidrolizi	Sitrat Kullanımı	TSI	Üre	İndol	VP	Hareket	%6.5'da Üreme	Nitrat İndirgenmesi	Kanlı Agarda Hemoliz
<i>B.cereus</i>	+	+	+	A	V	-	V	+	V	V	B
<i>B.mycoides</i>	+	+	+	A	V	-	V	+	V	V	V
<i>B.megaterium</i>	+	+	+	V	V	-	-	V	V	-	V
<i>B.licheniformis</i>	+	V	+	A	V	-	V	v	+	+	B
<i>B.subtilis</i>	+	+	+	A	V	-	V	V	+	V	V
<i>B.macerans</i>	+	V	-	A	V	-	-	V	-	+	-
<i>B.polymyxa</i>	+	V	-	A	-	-	+	+	V	+	V
<i>B.circulans</i>	+	-	-	A	-	-	-	+	-	+	-
<i>B.stearothermophilus</i>	V	-	-	A	V	-	-	+	-	+	-
<i>B.brevis</i>	+	V	V	Alk.	V	-	-	+	-	V	V
<i>B.sphaericus</i>	+	-	-	Alk.	V	-	-	+	V	V	V
<i>B.coagulans</i>	+	-	-	A	-	-	+	+	-	-	-
<i>B.lentus</i>	+	-	-	A	+	-	-	+	-	-	-

+: %90-100 Olumlu, -: %90-100 Olumsuz, V: %11-89 Olumlu, A: TSI'da Asit Reaksiyonu, Alk.: TSI'da Alkali Reaksiyonu

Bacillus suşlarının çeşitli şekerleri kullanma yeteneklerini test etmek amacıyla fermentasyon testleri kullanılmıştır. Kullanılan şekerler glukoz, ksiloz, mannitol, laktoz, sükröz ve maltoz'dur (Çizelge 2). Bu amaçla karbonhidrat fermentasyon besiyeri (Purple Broth Base-Difco) kullanılmıştır (KONEMAN et.al., 1992; TURNBULL and KRAMER, 1991).

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan *Bacillus* türlerinin karbohidrat reaksiyonları

<i>Bacillus</i> türleri	ASİT ÜRETİMİ					
	Glikoz	Ksiloz	Mannitol	Laktoz	Sükröz	Maltoz
<i>B.cereus</i>	+	-	-	-	V	+
<i>B.mycoides</i>	+	-	-	-	V	+
<i>B.megaterium</i>	+	V	+	V	+	V
<i>B.licheniformis</i>	+	V	+	-	+	+
<i>B.subtilis</i>	+	-	+	-	+	V
<i>B.macerans</i>	+	V	+	+	+	+
<i>B.polymyxa</i>	+	+	V	+	+	+
<i>B.circulans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B.stearothermophilus</i>	+	-	-	V	+	+
<i>B.brevis</i>	V	-	+	-	V	V
<i>B.sphaericus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>B.coagulans</i>	+	-	-	-	-	-
<i>B.lentus</i>	+	-	+	+	V	+

+: %90-100 Olumlu, -: %90-100 Olumsuz, V: %11-89 Olumlu

Araştırmamızda bu testler sonucunda *B.cereus*, *B.sphaericus*, *B.macerans*, *B.coagulans*, *B.lentus*, *B.megaterium*, *B.licheniformis*, *B.subtilis*, *B.stearothermophilus*, *B.mycoides*, *B.brevis*, *B.circulans* ve *b.polymyxa* türleri adlandırılmıştır.

Testler sonucunda adlandırılan *Bacillus* türlerinin beta-laktamaz enzim aktiviteleri Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemi iki farklı firmanın ürünleri karşılaştırmalı çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan birinci Nitrosefin yönteminde *Bacillus*'ların beta-laktamaz enzim aktivitesi "Beta-Lactamase Identification Sticks Oxoid BR 66 nolu" maddeler kullanılarak araştırılmıştır. *Bacillus*'ların beta-laktamaz enzimlerinin belirlenmesi için Glukoz Agar besiyerinde üretilen saf kültürlere stiklerin sarı kısımları dokundurularak beta-laktamaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Etken maddesi, kromojenik sefalosporin olan nitrosefin'dir. Nitrosefin stikler, çubuklar halindedir. Sarı uç renk değişimi gösteren indikatör bölgesidir. Nitrosefin stiklerin kullanılmadan önce nemlendirilmeleri gerekmektedir. Pozitif reaksiyonlarda beta, laktamaz enzimi, beta-laktam halkasındaki amid bağını hidrolize eder ve stiğin sarı ucu renk değiştirerek pembe veya kırmızıya dönüşür. Beta-laktamaz enzim aktivitesi pozitif *Bacillus*lar stik uçlarında sarıdan pembe ye renk değişikliği gösterirler (WASHINGTON, 1985; BAKER, 1982).

Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle *Bacillus*'ların beta,laktamaz enzim aktiviteleri araştırılırken, ikinci olarak Difco firmasının "DrySlight NITROSEFIN DIFCO LABORATORIES 3537" biyokimyasal maddesi kullanılmıştır. Bu amaçla Glukoz Agar besiyerinde üretilen saf *Bacillus* kültürlerinden alıp, daha önceden streil suyla ıslatılmış nitrosefin diski üzerinde iyice yayılır. Bakterilerin disk üzerinde yayıldığı alanda, bakterilerin beta-laktamaz enzim varlığı pozitif ise disk üzerinde 5-15 dakika içinde sarıdan kırmızı veya pembe renge dönüşen bir değişiklik gözlenmektedir ve renk değişikliği gözlenen bakteriler beta-laktamaz pozitif olarak değerlendirilir. Nitrosefin üzerinde herhangi bir renk değişikliği gözlenmemişse bu bakteriler de beta-laktamaz negatif olarak değerlendirilir (WASHINGTON, 1985; BAKER, 1982).

Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin yöntemiyle beta-laktamaz pozitif bulunan *Bacillus*'lar penisilin-G ile antibiyogramları çalışılarak kontrol edilmiştir. Ayrıca ampisilin ve imipenem antibiyotikleriyle de duyarlılık testleri yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde Mueller-Hünton besiyeri kullanılmış ve Kirby-bAuer metodu kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Ampisilin için dirençlilik ve hassasiyet değerleri 16mm \geq / \leq 17mm, imipenem için dirençlilik ve hassasiyet değerleri 13mm \geq ... / \leq 16mm ve penisilin-G için ise dirençlilik ve hassasiyet değerleri 19mm \geq ... / \geq 28mm olarak belirlenmiş ve sonuçlar bu değerlere göre hesaplanmıştır (Bauer, 1970).

BULGULAR

Çeşitli bölgelerden toplanan 195 çiğ süt örneğinden 28'inde *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneklerin bazılarında birden fazla *Bacillus* türü izole edildiği için 28 örnekte toplam 33 *Bacillus* tespit edilmiştir. 195 çiğ süt örneğinden 33 *Bacillus* (%16,9) izole edilmiştir. Çalışmada izole edilen *Bacillus*'ların morfolojik görünimleri

Çizelge 3. Çiğ Süt Örneklerinden İzole Edilen *Bacillus*'ların Türlerine Göre Dağılımı Ve İzolasyon Yüzdeleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türleri	İzole Edilen <i>Bacillus</i> sayısı	%
<i>Bacillus brevis</i>	3	%9
<i>Bacillus creus</i>	3	%9
<i>Bacillus circulans</i>	2	%6
<i>Bacillus coagulans</i>	2	%6
<i>Bacillus lentus</i>	2	%6
<i>Bacilluslicheniformis</i>	3	%9
<i>Bacillus macerans</i>	2	%6
<i>Bacillus megaterium</i>	1	%3
<i>Bacillus mycoides</i>	3	%9
<i>Bacillus poymxa</i>	3	%9
<i>Bacillus sphaericus</i>	3	%9
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	3	%9
<i>Bacillus subtilis</i>	3	%9
TOPLAM	33	

Not: %'ler 33 üzerinden hesaplanmıştır.

ve fizyolojik karakteristikleri çalışılarak tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada izole edilerek adlandırılan *Bacillus* türlerinin beta-laktamaz enzim aktiviteleri de değerlendirilerek beza-laktamaz pozitif ve negatif *Bacillus* türlerinin ampisilin ve imipenem antibiyotiklerine karşı hassasiyetleri de değerlendirilmiştir. Çalışmamızda çiğ süt örneklerinden izole edilen 33 *Bacillus*'un türlerine göre dağılımları ve izolasyon yüzdeleri Çizelge 3'de verilmiştir.

Araştırmamızda, çiğ süt örneklerinden izole edilen *Bacillus* türleri içinde en yaygın olarak görülen türler, *3B.brevis*

(%9), *3B.licheniformis* (%9), *3B.mycoides* (%9), *3B.sphaericus* (%9), *3 B.stearotherophilus* (%9) ve *3B.subtilis* (%9) türleridir. Tablodan da görüldüğü gibi 1 *B.megaterium*(%3) türünün izolasyonu ise düşük oranlarda gerçekleştirilmiştir.

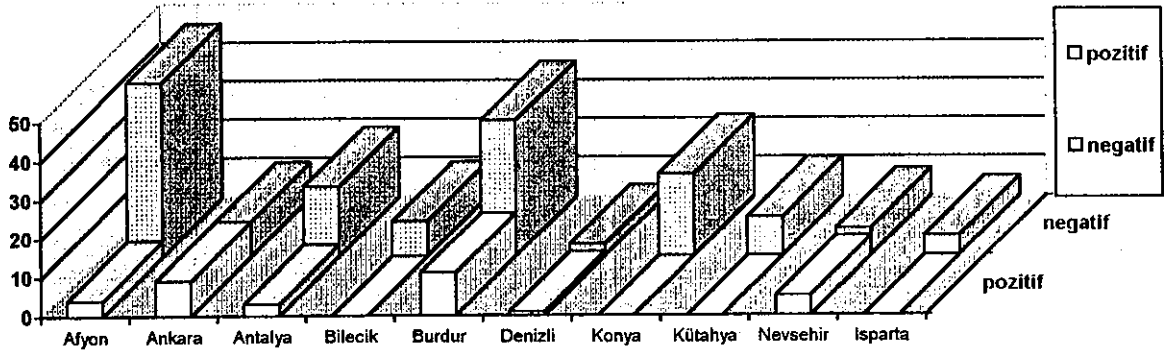
Çalışılan 28 çiğ süt örneğinin 23'ünde tek bir *Bacillus* türü izole edilirken, 5 çiğ süt örneğinin ise 1'den fazla *Bacillus* türü izole edilmiştir. Çiğ süt örneklerinde birden fazla izole edilen *Bacillus* türleri çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Aynı Çiğ Süt Örneğinden Birden Fazla İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Dağılımları

Çiğ süt örnek no	<i>B. stearother.</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. polymxa</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. macerans</i>
29.		+		+		+				
126.			+		+					
134.							+	+		
98.	+								+	
19.	+									+
Toplam	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Birden fazla *Bacillus* izole edilen 5 örnekten 10 *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4'de aynı çiğ süt örneğinden birden fazla izole edilen *Bacillus* türleri görülmektedir. Çalışmada bir çiğ süt örneğinden üç ayrı *Bacillus* türü izole edilmiştir. Geriye kalan dört çiğ süt örneğinden iki farklı *Bacillus* türü izole edilmiştir. Ancak bu örneklerin de her birinden farklı farklı türler izole edilmiştir. Araştırmada 29 nolu örnekten *B.coagulans*, *B.polymxa* ve *B.lentus* türleri; 126 nolu örnekten *B.cereus* ve *B.mycoides* türleri; 134 nolu örnekten *B.subtilis* ve *B.circulans* türleri; 98 nolu örnekten *B.licheniformis* ve *b.stearotherophilus*

Araştırmamızda çiğ süt örnekleri Afyon, Ankara, Antalya, Burdur, Denizli ve Nevşehir olmak üzere 6 farklı yöreden alınarak *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 195 çiğ süt örneğinin çalışıldığı yöreler Şekil 1'de görülmektedir.



Pozitif: *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilen çiğ süt örnek sayısı

Negatif: *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilemeyen çiğ süt örnek sayısı

Şekil 1. Çeşitli yörelerden alınarak çalışılan çiğ süt örneklerinin yörelere göre dağılımı

Şekil 1'de verilen tabloya göre en çok *Bacillus* izolasyonu Burdur yöresinden gelen çiğ sütlerden gerçekleştirilmiştir. Burdur'dan alınan çiğ süt örneğinin 11'inden *Bacillus* izole edilmiştir. İkinci sıklıkta *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilen çiğ sütler, Ankara bölgesinden gelen çiğ sütlerdir. Bu yöreden alınan 18 çiğ süt örneğinin 9'unda *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. En az *Bacillus* izolasyonu Denizli'den gelen çiğ sütlerden elde edilmiştir. Denizli'den alınarak çalışılan 4 çiğ süt örneğinde 1 *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çiğ süt örneklerinin alındığı yörelere göre dağılımları ve izole edilen *Bacillus* türleri de çizelge 5'de verilmiştir.

Çizelge 5. Çiğ Süt Örneklerinin Alındığı Yörelere Göre Dağılımları ve İzole Edilen *Bacillus* Türleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türleri	Afyon	Ankara	Antalya	Burdur	Denizli	Nevşehir	Toplam
<i>B.brevis</i>		2		1			3
<i>B.cereus</i>		1		2			3
<i>B.circulans</i>			1	1		2	
<i>B.coagulans</i>	1	1					2
<i>B.lentus</i>		1		1		1	2
<i>B.licheniformis</i>			1	2			3
<i>B.macerans</i>	1	1					2
<i>B.megaterium</i>			1				1
<i>B.mycoides</i>	1	2					3
<i>B.polymxa</i>		1		1		1	3
<i>B.sphaericus</i>				1	1	1	3
<i>B.stearothermophilus</i>	1					2	3
<i>B.subtilis</i>				2		1	3
TOPLAM	4	9	3	11	1	5	33

Çizelge 5.'den de görüldüğü gibi en fazla *Bacillus* izolasyonu Burdur yöresinden gelen çiğ sütlerden gerçekleştirilmiştir. Burdur bölgesinden gelen çiğ sütlerden en çok izole edilen *Bacillus* türleri önemli gıda patojenleri olan *B.cereus*, *B.licheniformis* ve *B.subtilis* türleridir. İkinci önemli izolasyon bölgesi Ankara bölgesidir. Ankara bölgesinden de gıda patojeni olan *B.cereus* türü izole edilmiştir. Bunun dışında bu bölgede *B.brevis* ve *B. mycoides* türleri de fazla oranda izole edilmiştir. En az *Bacillus* izolasyonu Denizli bölgesinden gelen çiğ süt örneklerinden izole edilmiştir.

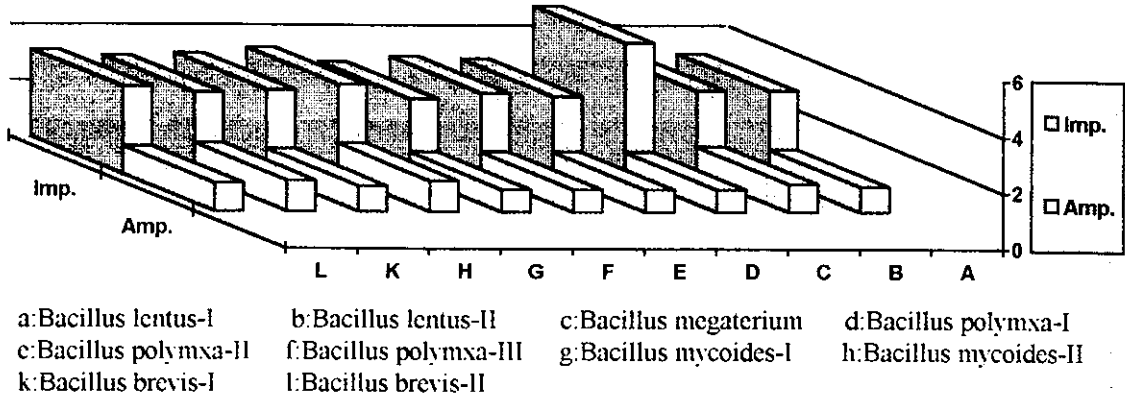
Çiğ süt örneklerinden izole edilerek adlandırılan *Bacillus*ların beta-laktamaz enzim aktiviteleri Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemi ile çalışılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) Yöntemi ile Beta Laktamaz Enzim Varlığı Pozitif ve Negatif Bulunan *Bacillus* Türleri Sayısı Ve Dağılımları

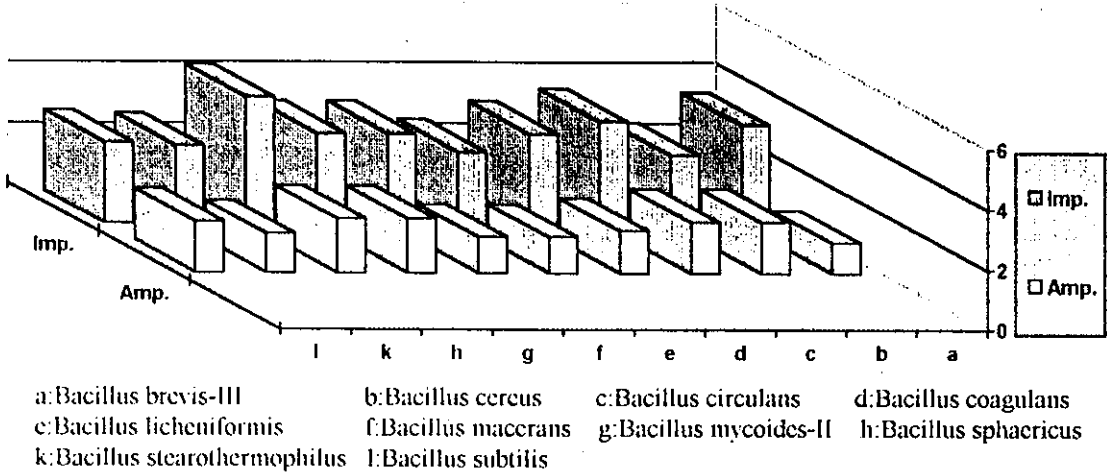
<i>Bacillus</i> türleri	Nitrosefin Test Yöntemi ile Beta-Laktamaz Tayini Yapılan pozitif <i>Bacillus</i> sayısı negatif <i>Bacillus</i> sayısı			
	+	2	-	3
<i>Bacillus lentus</i>	+	2		
<i>Bacillus circulans</i>			-	2
<i>Bacillus subtilis</i>			-	3
<i>Bacillus macerans</i>			-	2
<i>Bacillus cereus</i>			-	3
<i>Bacillus coagulans</i>			-	2
<i>Bacillus licheniformis</i>			-	3
<i>Bacillus sphaericus</i>			-	3
<i>Bacillus megaterium</i>	+	1		
<i>Bacillus brevis</i>	+	2	-	1
<i>Bacillus mycoides</i>	+	2	-	1
<i>Bacillus polymxa</i>	+	3		
<i>Bacillus stearothermophilus</i>			-	3
TOPLAM		10		23

Çizelge 6'dan da görüldüğü gibi beta-laktamaz enzim varlıkları Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle çalışılan 33 *Bacillus* suşunun 10'unda beta-laktamaz enzim varlığı pozitif ve 23'ünde de beta-laktamaz enzim varlığı negatif olarak tesbit edilmiştir. Beta-laktamaz enzim varlığı pozitif olarak tespit edilen 10 *Bacillus*'un; 2'ser tanesi *B.brevis*, *B.lentus*, *B.mycoides*, 3 tanesi *B.polymxa* ve 1 tanesi de *B. megaterium* olarak değerlendirilmiştir.

Beta-laktamaz enzim varlığı pozitif olarak değerlendirilen *Bacillus*'lar Kromojenik Sefalosporin Test (Nitro-sefin) yöntemine ilave olarak penisilin-G antibiyotiği ile de test edilerek doğrulanmıştır. Sonuçta beta-laktamaz pozitif bulunan *Bacillus* türlerinin penisilin-G antibiyotiğine karşı %100 dirençli oldukları tespit edilmiştir. Beta-laktamaz enzim varlığı pozitif ve negatif olarak değerlendirilen *Bacillus* türlerinin imipenem ve ampisilin antibiyotiklerine karşı hassasiyet ve dirençlilikleri Şekil 2 ve Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 2. Beta-laktamaz enzim varlığı pozitif olarak değerlendirilen *Bacillus* türlerinin İmipenem ve Ampisilin antibiyotiklerine karşı hassasiyet ve dirençlilikleri



Şekil 3. Beta-laktamaz enzim varlığı negatif olarak değerlendirilen *Bacillus* türlerinin İmipenem ve Ampisilin antibiyotiklerine karşı hassasiyet ve dirençlilikleri

Beta-laktamaz enzim aktivitesi pozitif ve negatif olan *Bacillus*'lar daha sonra imipenem ve ampisilin antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Bu amaçla *Bacillus*'ların antibiyotikler üzerine duyarlılıklarının tespitinde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda beta-laktamaz enzimi pozitif olarak değerlendirilen tüm *Bacillus* türlerinin imipenem antibiyotiğine karşı %100 hassasiyet gösterdikleri tespit edilmiştir. Beta-laktamaz pozitif *Bacillus*'ların ampisilin antibiyotiğine karşı %100 dirençlilik gösterdikleri tespit edilmiştir. Beta-laktamaz enzim aktivitesi negatif olarak değerlendirilen *Bacillus* türlerinin tümünün imipenem antibiyotiklerine karşı %100 hassasiyet gösterdikleri tespit edilmiştir. Ampisilin antibiyotiğine karşı ise *B. brevis*-III, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans* ve *B. stearothermophilus* türlerinin dirençli oldukları tespit edilmiştir. Geriye kalan diğer beta-laktamaz negatif *Bacillus* türlerinin tümü ampisilin antibiyotiğine karşı hassasiyetleri tespit edilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

*Bacillus*ların sentezledikleri beta-laktamaz gibi klinik açıdan önemli enzimleri de bulunmaktadır. Bu enzim, sentezlendiği bakteriye çok yönlü direnç kazandırmaktadır. Beta-laktamaz enzimi, beta-laktam antibiyotiklerini inhibe eden enzimlerdir. Beta-laktamaz enzimi taşıyan bakterilerin süt ve süt ürünlerinde bulunmaları nedeniyle halk sağlığını olumsuz yönde etkileyebilmektedirler. Araştırmamızda bütün bu düşüncelerden yola çıkarak çiğ sütlerdeki *Bacillus* türlerinin izolasyonu, adlandırılmaları ve *Bacillus* türlerinin beta-laktamaz enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

KALOGRİDOU ve ark. (1992) yapmış oldukları çalışmalarında, ekşimiş sütlerden 40 *Bacillus* suşu izole edilmiştir. İzole edilen *Bacillus*lardan 15'i *B.coagulns*, 10'u *B.licheniformis* ve 5'er tane olmak üzere *B.stearothermophilus*, *B.macerans* ve *B.subtilis*'tir.

RANGASAMY ve ark. (1993) çalışmalarında Victorian'dan aldıkları 24 çiğ süt örneğinden 9 *Bacillus cereus* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Çalışılan 195 çiğ süt örneğinden 33 *Bacillus* (%16,9) türü izole edilmiştir. Araştırmamıza paralel olarak, Shin ve arkadaşlarının 1993 yılındaki çalışmalarında çiğ süt örneklerinden %15,5 oranında *Bacillus* izole edilmiştir. Her iki çalışmada da elde edilen izolasyon yüzdeleri arasında bir birine yakın değerler gözlenmiştir.

Çalışmamızda izole edilen 13 *Bacillus* türü arasında, sütlerde bozulmalara neden olan ve ayrıca insan sağlığını tehdit eden *Bacillus* türleri de elde edilmiştir. Buna göre araştırmamızda en sıklıkla *B.brevis*, *B.cereus*, *B.licheniformis*, *B.mycoides*, *B.polymxa*, *B.sphaericus* ve *B.stearothermophilus* türleri izole edilmiştir. *B.megaterium* türü ise çiğ sütlerden çok az sayıda izole edilebilmiştir (Çizelge 1).

MEER ve ark., (1993) çalışmalarında Oregan Grade çiğ süt örneklerinden 102 *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu izolatlardan 12 farklı *Bacillus* türü izole edilmiştir. Bu türler içinde en fazla *B.licheniformis* (%18), en az oranda da *B.laterosporus* (%2) türü tespit izole edilmiştir. Bu türler içinde en fazla *B.licheniformis* (%18), en az oranda da *B.laterosporus* (%2) türü tespit edilmiştir. Bizim araştırmamızda da 13 farklı *Bacillus* türü izole edilmiştir. Bu türler içinde en fazla 3 *B.brevis* (%9), 3 *B.cereus* (%9), 3 *B.licheniformis* (%9), 3 *B.mycoides* (%9), 3 *B.polymxa* (%9), 3 *B.sphaericus*(%9), 3 *B.subtilis* (9), 3 *B.stearothermophilus*(%9), 2 *B.circulans* (%6), 2 *B.coagulans* (%6), 2 *B.lentus* (%6), 2 *B.macerans* (%6) türleri ve en az oranda da 1 *B.megaterium* (%3) türü izole edilmiştir. MEER ve ark. çalışmasında 12 farklı *Bacillus* türü izole edilirken bizim çalışmamızda da 13 farklı *Bacillus* türü izole edilmiştir. *Bacillus* izolat sayımız birbirine yakınlık göstermektedir. Araştırmacıların yapmış oldukları çalışmada en fazla oranda *B.licheniformis* (%18) türü izole edilmiştir. Bizim çalışmamızda da *B.licheniformis* (%9) türü en fazla izole edilen türler arasında yer almaktadır. Fakat çalışmamızda *B.laterosporus* türü izole edilememiştir. Sonuçlarımız birbirini desteklemektedir.

Araştırmamızda *B.brevis*, *B.cereus*, *B.circulans*, *B.licheniformis*, *B.mycoides*, *B.polymxa*, *B.sphaericus* ve *B.stearothermophilus* türleri en fazla izole edilen türlerdir. Ancak VASSILIADOU ve ark. (1989) yılında süt ürünlerinden *B.stearothermophilus* türünden 1 tane izole etmişlerdir. Diğer izole edilen *Bacillus* türleri ise bizim çalışmamızda izole edilen türler arasında olup *B.coagulans*, *B.licheniformis*, *B.subtilis*, *B.macerans* ve *B.cereus* türleridir.

URAZ ve ark. (1996) yapmış oldukları çalışmalarında, çeşitli süt işletmelerinden sağlanan çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden toplam 72 *Bacillus* izole etmişlerdir. İzolasyonları gerçekleştirilen *Bacillus* türleri arasında, *B.cereus*, *B.lentus*, *B.brevis*, *B.firmus*, *B.thuringiensis*, *B.polymxa*, *B.circulans*, *B.pumilis*, *B.megaterium*, *B.sphaericus*, *B.anthraxis* ve *B.macerans* türleri bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda da *B.cereus*, *B.lentus*, *B.brevis*, *B.polymxa*, *B.circulans*, *B.megaterium*, *B.sphaericus* ve *B.macerans* türleri izolasyonunu gerçekleştirdiğimiz *Bacillus* türleri arasındadır. Fakat çalışmamızda *B.firmus*, *B.thuringiensis*, *B.pumilis* ve *B.anthraxis* türleri izole edilememiştir. Sonuçlarımız birbirini desteklemektedir.

Çiğ sütlerde bulunan *Bacillus* türlerinin bazıları patojen olarak kabul edilirler. Çalışmamızda izole ettiğimiz *B.cereus* türü de insanlarda bezin zehirlenmesine sebep olmaktadır.

Araştırmamızda izolasyonunu gerçekleştirdiğimiz türler arasında olan *Bacillus subtilis*'in göze bulaşması sonucunda panoftalmi ve iridosiklit gibi göz yangınları meydana gelmektedir. *B.subtilis* süt, süt ürünleri ve ekmek gibi bazı besin maddelerinin bozulmasına sebep olduğu gibi, insanda besin zehirlenmesine de yol açabilmektedir.

Ayrıca çalışmamızda izolasyonlarını gerçekleştirdiğimiz *B.licheniformis*, *B. brevis* ve *B.megaterium* türleri de diyare ve emetik tipteki besin zehirlenmesine sebep olan *Bacillus* türleri arasındadır. *B.sphaericus* türü de izole ettiğimiz patojen *Bacillus* türleri arasında yer almaktadır.

Süt ve süt ürünlerinde bulunan *Bacillus* türlerinin bazıları patojen olabildikleri ölçüde, sentezledikleri beta-laktamaz enzimleri ile sütün yapısının bozulmasına sebep olur. Bu nedenden dolayı süt ve süt ürünlerinde beta-laktamaz enzimlerinin bulunması sütün bozulmasına ve ekonomik açıdan kayıplara sebep olmaktadır.

Araştırmamızda çiğ sütlerden *Bacillus* izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla öncelikle Glukoz agar kullanılmıştır. Ancak çiğ süt örneklerinin ilk ekimleri için PCA besiyerleri kullanılmıştır. Buradan şüpheli koloniler glukoz agara yeniden ekilmiştir. Bu besiyerinde üreyen bakterilerin yeniden biyoşimileri yapılarak adlandırılmışlardır. Garcia ve arkadaşları 1993 yılındaki çalışmalarında çiğ sütlerde PCA besiyerine ekim yaparak bizim araştırmamızda izole ettiğimiz *B.megaterium* ve *B.subtilis* türlerini izole etmişlerdir.

Beta-laktamaz enzimi, *Bacillus* türlerinin sentezlediği pek çok enzim arasında yer almaktadır. *Bacillus* türlerinin sentezlediği enzimler olan, proteinaz ve beta-laktamaz enzimleri, süt ve süt ürünlerinde kalite ve tat bozukluklarına sebep olmaktadır. Süt ve süt ürünlerinin bozulmasına neden olan bu enzimler, aynı zamanda *Bacillus*'larda antibiyotiklere karşı direnç kazanmasında rol almaktadır. Sütün insanlar tarafından bol miktarda tüketilmesiyle, sütte bulunan *Bacillus*'lar insan organizmasına koylaca geçerek insan sağlığını etkileyebilmektedir.

Çalışmamız sonucunda beta-laktamaz pozitif olarak değerlendirilen 10 *Bacillus* türü tespit edilmiştir. Beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilen *Bacillus* türleri, *Bacillus lentus-I*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus lentus-II*, *Bacillus brevis-I*, *Bacillus brevis-II*, *Bacillus mycooides-I*, *Bacillus mycooides-II*, *Bacillus polymxa-I* *Bacillus polymxa-II* ve *Bacillus polymxa-III* türleridir.

Baker 1992 yılında yapmış olduğu çalışmasında Kromojenik Sefalosporin Test Yöntemini kullanarak *Bacillus*'ların beta-laktamaz enzim aktivitesini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus*'un extracellular beta-laktamaz enzimlerini sentezlediğini tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu araştırmacıdan farklı olarak *B.cereus* ve *B.subtilis* türleri her iki test yöntemiyle de betalaktamaz negatif olarak tespit edilmiştir.

TUMBULL ve KRAMER (1991) yılındaki çalışmalarında, *B.cereus* ve *B.thuringiensis* suşlarının beta-laktamaz enzimi sentezlediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmalarında bu suşların hepsinin penisilin antibiyotiğine karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda *B.cereus* türü beta-laktamaz negatif olarak tespit edilmiştir. Beta-laktamaz pozitif olarak değerlendirilen *Bacillus* izolatlarımızın hepsinin penisilin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu bulunmuştur.

URAZ ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada, beta-laktamaz aenzim aktivitesi pozitif ve negatif olarak bulunan *Bacillus* türlerinin imipenem antibiyotiğine karşı hassasiyetlerini araştırmışlardır. Çalışmalarında, beta-laktamaz pozitif ve negatif *Bacillus* türlerinin imipenem antibiyotiğine karşı %100 hassas oldukları bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da beta-laktamaz enzim aktivitesi pozitif ve negatif olarak tesbit edilen *Bacillus* türlerinin imipenem antibiyotiğine karşı hassasiyetleri tesbit edilmiştir. Çalışma sonuçlarımız birbirini desteklemektedir.

Sonuç olarak çiğ sütlerde bulunabilen ısıya dayanıklı, sporlu bakteriler olan *Bacillus*'ların enzim aktivitelerinin varlığı gösterilmiştir. Aynı zamanda izole ettiğimiz türler arasında besin zehirlenmesine sebep olan *B.cereus*, *B.licheniformis* ve *B.lentus* türlerinin bulunması da bu bakterilerin çiğ sütlerde bulunma sıklığının önemini ortaya çıkarmaktadır.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 1981, Türk Standartları Enstitüsü, Çiğ Süt TS 1018.
- BAKER, W.L., 1992, Co-existence of Beta-lactamase and penicilin acylase in bacteria; detection and quantitative determination of enzyme activities: Journal of Applied Bacteriology, 73, 14-22.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M. SHERRIS, J.C. and TRUCK, M., 1970, Antibiotic susceptibility testing a standardized single disk method: Am.J. Clin Path., 45(4), 493.
- CHAND, R., AGGARVAL, P.K. and RATTAN, C., 1990, Penicilinase producing *Bacillus* species in milk: Brief Communications of the XXIII International Dairy Congress, Montreal, Vol. 1, 195.

- GARCIA, M.R., PRIETO, M., ALANSO, CA., LOPEZ, M.L.G., FERNANDEZ, M.L.G. and OTERO, A., 1993, Numerical taxonomy of psychrotrophic bacteria isolated from raw ewes milk: *Journal of Dairy Research*, 60, 371-383.
- HARMON, S.M., KAUTTER, D.A. and MC CLURE, F.D., 1984, Comparison of selective plating media for enumeration of *Bacillus cereus* in foods: *Journal of Food Protection*, Vol. 47, No: 1, 65-67.
- 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.
- JACKSON, G.J., 1990, Public health and research perspectives on the microbial contamination of foods: *J. Amin. Sci.*, 68, 884-891.
- KALOGRIDOU, V.D., 1992, Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk: *Journal of Dairy Science*, 75, 10, 2681-2686.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECHENBERGER, P.C. and JR. WINN, C.W., 1992, *Bacillus* species: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Fourth Edition, 469-478.
- LABERAU, N.R. and MAIR, W.H., 1968, Bacteriologie der kase, In "Handbuch der Lebensmittel Chemie" 3. Band, 1. Teil. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-Newyork.
- MADGWICH, P.J. and WALEY, S.G., 1987, b-Lactamase I from *Bacillus cereus*: *Biochem. J.*, 248, 657-662.
- MEER, R.R., WODBURN, M.J. and BODY FELT, F.W., 1993, Identification and characterization of head resistant psychrotrophic bacteria in Oregon Grade A raw milk: *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 13 (11), 631-637.
- MOSSO, M.A., ARRIBAS, M.L.G., CUENA, J.A. and ROSA, M.C., 1989, Enumeration of *Bacillus* and *Bacillus cereus* spores in food from Spain: *Journal of Food Protection*. Vol. 52. No. 3, 184-188.
- NAKAMURA, A., TOYAMA, N., KITAMURA, A., MASAKI, H., UOZOMI, T., 1991, Use of a Triple Protease -deficient Mutant of *Bacillus subtilis* as a Host for Secretion of a *B.subtilis* Cellulase and TEM b-Lactamase: *Agric. Biol. Chem.*, 55 (9), 2367-2374.
- PETER, C.B., TURNBULL AND JOHN M. KRAMER, 1995, *Bacillus* species: Manual of Clinical Microbiology, Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, R.H., Sixth Edition. Vol. 28, 349-356.
- PETERZ, M., WIBERG, C. AND NORBERG, P., 1985, Comparison of media for isolation of *Bacillus cereus* from foods: *Journal of Food Protection*, Vol. 48, No. 11, 969-970.
- RANGASAMY, P.N., IYER, M. AND ROGINSKI, H., 1993, Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria: *The Australian Journal of Dairy Technology*, Vol. 48, 93-95.
- RAYKOWSKI, K.T. ND MIKOLAJCIK, E.M., 1987, Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*: *Journal of Food Protection*, Vol. 50, No. 3, 199-205.
- SHIN, Y.K., KWAK, H.S. AND KIM, J.W. 1993, Identification of psychrotrophic bacteria in raw milk: *Korean Journal of Dairy Science*, 15 (2), 87-94.
- THAM, W.A., HAYDU, L.J. AND DANIELSSON-THAM, M.L.V. 1990, Bacteriological, quality of on-farm manufactured goat cheese: *Epidemiol. Infect.*, 104, 87-100.
- TURNBULL, P.C.B. AND KRAMER, J.M., 1991, *Bacillus*: Manual of Clinical Microbiology, Fifty Edition, Balows, A., Tenover, F.C., Tenover, R.H., Herman, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J., American Society for Microbiology Washington D.C., 296-303.
- URAZ, G.- ARSLAN S., GÜNDOĞAN, N., 1996, Çiğ süt Pastörize Süt ve Beyaz Peynir örneklerinden izole edilen ve İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz varlığı saptanan *Bacillus* türleri, *Gıda*, 21(4): 275-280.
- URAZ, G.- MARAŞ Y., Beta-Laktamaz enzim aktivitesi pozitif ve negatif olan *Bacillus* türleri üzerine bazı antibiyotiklerin etkisi, III. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi, 2-6 Haziran 1997, Antalya.
- WASHINGTON, J.A., 1985, *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*, 2nd Edition United States of America, 150.