

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI



**BEBEK VE ÇOCUK BESLENMESİNDE KULLANILAN GIDALARDA
BACILLUS CEREUS VARLIĞI İLE İZOLATLARIN TOKSİJENİK
ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Edip URHAN

Danışman
Doç. Dr. Hayriye Yeşim CAN

HATAY-2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**BEBEK VE ÇOCUK BESLENMESİNDE KULLANILAN GIDALARDA
BACILLUS CEREUS VARLIĞI İLE İZOLATLARIN TOKSİJENİK
ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Edip URHAN

Danışman

Doç. Dr. Hayriye Yeşim CAN

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21.YL.024 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**BEBEK VE ÇOCUK BESLENMESİNDE KULLANILAN GIDALARDA
BACILLUS CEREUS VARLIĞI İLE İZOLATLARIN TOKSİJENİK
ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Edip URHAN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 01/09/2022günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:	Jüri başkanı: Prof. Dr. Mehmet ELMALI	(imza):
	Üye: Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN	(imza):
	Üye: Doç. Dr. H. Yeşim CAN	(imza):

Bu tez, Enstitümüz Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Tarih
(İmza Yeri)
Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan, sabırla ve ilgiyle bana yol gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Hayriye Yeşim CAN'a saygı ve şükranlarımı sunarım. Çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Mehmet ELMALI'ya, değerli hocam Doç. Dr. Sevdâ PEHLİVANLAR ÖNEN'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda büyük bir samimiyetle bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana destek olan dostum Hemşire Seyit Ali BAYTAR'a ve eğitim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Bebek Maması Tanımı ve Genel Özellikleri	3
2.2. Bebek Maması Üretimi	4
2.3. <i>B. cereus</i> 'un Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri	7
2.4. <i>B. cereus</i> 'un Toksik Özellikleri	9
2.5. <i>B. cereus</i> 'un Gıdalarda Bulunuşu	11
2.6. Gıda Kaynaklı <i>B. cereus</i> İntoksikasyonları ve Önlenmesi	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Besi Yerleri ve Diğer Kimyasal Maddeler	15
3.1.2. Moleküler Analizlerde Kullanılan Malzemeler	16
3.2. Yöntem	19
3.2.1. <i>B. cereus</i> 'un İzolasyon ve İdentifikasyonu	19
3.2.1.1. Ön Zenginleştirme	19
3.2.1.2. Katı Besiyerine Ekim	19
3.2.1.3. Hemoliz Yeteneğinin Belirlenmesi	20
3.2.2. Moleküler Analizler	21
3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu	21
3.2.2.2. İzolatların PCR Yöntemiyle Doğrulanması	22
3.2.2.3. Amplikonların Agaroze Jele Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi	23
3.2.2.4. İzolatlarda Toksin Genlerinin Varlığının Araştırılması	23
3.2.3. Psikrotrofik Özelliğinin Belirlenmesi	24
3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme	24
4. BULGULAR	25
4.1. Klasik Kültür Tekniği Analiz Sonuçları	25
4.2. PCR Analizi Sonuçları	26
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ	40
7. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Şüpheli <i>B. cereus</i> kolonilerinin katı agardaki görünümü.....	20
Şekil 4.1.	Elde edilen <i>B. cereus</i> suşlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	26
Şekil 4.2.	Elde edilen bazı izolatlarda toksin genlerinin varlığı.....	27



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	<i>B. cereus</i> 'un neden olduğu emetik ve diyarel sendromun karşılaştırılması.....	10
Çizelge 3.1.	Primer çiftleri ve amplikon büyüklükleri.....	16
Çizelge 4.1.	Kavanoz mamalarında <i>B. cereus</i> varlığı.....	28
Çizelge 4.2.	Toz halindeki mamalarda <i>B. cereus</i> varlığı.....	29
Çizelge 4.3.	Tahıl bazlı örneklerde <i>B. cereus</i> varlığı.....	31
Çizelge 4.4.	Elde edilen <i>B. cereus</i> suşlarının virülens özellikleri.....	32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

a_w	Water activity
bp	Base pair
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
D-değeri	Decimal reduction time
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Dinükleotittrifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
EMS	En Muhtemel Sayı
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Gram
<i>g</i>	Gravity
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IU	International unit
kob	Koloni oluşturan birim
kDa	Kilo Dalton
log	Logaritma
μl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
pmol	Picomole
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Power of Hydrogen
sn	Saniye
TBE	Tris-Borate-EDTA
UV	Ultraviyole
WHO	World Health Organization

ÖZET

Bebek ve çocuk beslenmesinde kullanılan gıdalarda *Bacillus cereus* varlığı ile izolatların toksijenik özelliğinin belirlenmesi

Bu tez çalışmasında, farklı firmalara ait 30 adet yerli ve ithal olarak üretilen toz formunda bebek maması, 25 adet cam kavanozda konserve formundaki mama ile 25 adet bebek beslenmesinde kullanılan tahıl bazlı ürünler (açık veya kapalı formda satılan un, nişasta, pirinç unu ve irmik) materyal olarak kullanıldı. Toplam 80 adet örnek, *Bacillus cereus* varlığı yönünden klasik kültür tekniği ve PCR yöntemi ile incelendi. Elde edilen izolatlar hemolizin geni hedef alınarak *B. cereus* olarak doğrulandı. Doğrulan izolatlarda toksin genlerinin (*nhe*, *hbl*, *cytK*, *ces*) varlığı multipleks PCR yöntemiyle araştırıldı.

Çalışmanın sonucunda, analize alınan toplam 80 örneğin 50'sinden (% 62.5) *B. cereus* izole edildi. Cam kavanozda konserve tipindeki mama örneklerinde *B. cereus*'a rastlanılmadı. Toz formundaki bebek mamaları ile tahıl bazlı ürünler sırasıyla % 83.3, % 100 düzeylerinde *B. cereus* ile kontamine olarak bulundu. Pozitif örneklerden elde edilen, toplam 50 adet izolat hemolizin geni hedef alınarak PCR ile doğrulandı. Toplam 13 izolatta enterotoksin genine rastlanılarak, izolatların % 26'sının enterotoksijenik özellikte olduğu bulundu. Üç izolatta sadece *nhe* genine, 10 izolatta hem *nhe* hem de *cytK* genlerine birlikte rastlanıldı. Emetik sendromdan sorumlu toksini kodlayan *ces* ile diyarel sendromdan sorumlu toksini kodlayan *hbl* genlerini hiçbir izolatın taşımadığı gözlemlendi.

Fenotipik olarak, tüm izolatların kanlı agarda hemoliz oluşturabildiği bulundu. İki izolatın psikrotrofik özellikte olduğu ve 7 °C'de üreyebildiği saptandı. Bu sonuçlar, bebek ve küçük çocuk beslenmesinde kullanılan gıdaların, toksijenik ve psikrotrofik özellikteki *B. cereus* suşlarının varlığı açısından risk taşıyabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *B. cereus*, bebek maması, *nhe*, *cytK*, *ces*.

ABSTRACT

Determination of the presence of *Bacillus cereus* in foods used for baby and child nutrition and its toxigenic properties

In this study, 30 domestic and imported dried baby formulas, 25 canned baby formulas, and 25 cereal based products (flour, starch, rice flour and semolina sold in packed or unpacked form) belonging to different companies were used as materials. A total of 80 samples were examined for the presence of *Bacillus cereus* by classical culture technique and PCR method. The obtained isolates were confirmed as *B. cereus* by targeting the hemolysin gene. The presence of toxin genes (*nhe*, *hbl*, *cytK*, *ces*) was investigated by multiplex PCR method.

As a result of the study, *B. cereus* was isolated from 50 (62.5 %) of the total 80 samples analyzed. *B. cereus* was not found in canned baby formula samples. Dried baby formulas and cereal based products were found to be contaminated with *B. cereus* at a level of 83.3 %, 100 %, respectively. A total of 50 isolates obtained from positive samples were confirmed by PCR by targeting the hemolysin gene. Enterotoxin genes were found in a total of 13 isolates, and 26 % of the isolates were found to be enterotoxigenic. The *nhe* gene was only found in three isolates, and both *nhe* and *cytK* genes were found in 10 isolates. It was observed that none of the isolates carried the *ces* gene encoding the toxin responsible for emetic syndrome and the *hbl* gene encoding the toxin responsible for diarrheal syndrome.

All of the isolates were phenotypically found to be capable of hemolysis on blood agar. It was determined that two isolates were psychrotrophic and can grow at 7 °C. These results indicate that the foods used for infant and young child nutrition may carry a risk for the presence of toxigenic and psychrotrophic *B. cereus* strains.

Keywords: *B. cereus*, infant formula, *nhe*, *cytK*, *ces*.

1. GİRİŞ

Beslenme bozuklukları tüm dünyada sosyomedikal bir sorun olarak karşımıza çıkmakta olup, bu durumla özellikle gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde daha sık olarak karşılaşılmaktadır. Bebekler ve çocuklar için yeterli ve dengeli beslenme oldukça önem taşımaktadır. Çünkü bu yaş grubu sürekli büyüme ve gelişme periyodunun içerisinde (Arnold ve ark. 1981). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, 5 yaşın altındaki çocuklarda meydana gelen ölümlerin yaklaşık olarak % 45'inin yetersiz beslenme ile ilgili olduğu bildirilmiştir (WHO 2021a, 2021b). Yetersiz beslenme, çocukların yaygın infeksiyonlara yakalanma riski ile infeksiyonların görülme sıklığını ve şiddetini arttırarak, iyileşmeyi geciktirmektedir (Selçuk 2012).

Bebeklerin ilk altı ay boyunca anne sütü alması, sağlıklı büyüme ve gelişmeleri için kritik öneme sahiptir. Ancak anne sütünün tek başına yetersiz olduğu ya da bebeğe verilmesinin uygun olmadığı dönemlerde hazır mamalar kullanılabilmektedir. Bu kapsamda, bebek beslenmesinde kullanılan gıdaların hijyenik kalitesi ve güvenilirliği oldukça önemlidir (FAO/WHO 2004, Rahimi ve ark. 2013, WHO 2021b, WHO 2022). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre, bebek ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek gıdalarında aranması gereken mikroorganizmalar arasında *Bacillus cereus* yer almaktadır (Anonim 2011).

Bu tez çalışmasında, i) bebek ve çocuk beslenmesinde kullanılan gıdalarda (ithal veya yerli olarak üretilen toz formundaki mamalar, cam kavanozda konserve formundaki mamalar ile tahıl bazlı ürünler) *B. cereus*'un saptanması, ii) izolatların hemoliz oluşturma yeteneği ile psikrotrofik özelliklerinin belirlenmesi, iii) izolatlarda emetik ve diyareal toksin genlerinin (*ces*, *nhe*, *hbl*, *cytK*) varlığının multipleks PCR yöntemi ile tespit edilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Bebek ve çocukların yeterli ve dengeli beslenebilmesi, normal gelişimlerini sürdürebilmeleri için protein, vitamin, mineral, kalori gereksinimine uygun olarak hazırlanan mamaların tercih edilmesi önemli olup, dolayısıyla tüm dünyada teknolojinin gelişimine paralel olarak üretilen mamalarla beslenme yaygınlaşmıştır. Bebek ve çocukları süt dışında diğer gıdalara alıştırmak amacıyla üretilen çeşitli hazır mamalar da vardır. Ancak, bebek ve çocuklarda immunolojik savunma mekanizmaları ile bağırsak mikrobiotası tam olarak gelişemediğinden, yetişkin bireylere göre, gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına karşı daha duyarlı olmaktadır. Bu kapsamda, beslenmelerinde kullanılan gıdaların güvenilirliği ile mikrobiyolojik yönden kalitesinin belirlenmesi gerekmektedir (Ergün ve ark. 2002, Rahimi ve ark. 2013, Stoeckel ve ark. 2013, Pei ve ark. 2018).

Türk Gıda Kodeksi (TGK)'ne göre, bebek ve küçük çocuk beslenmesinde kullanılan hazır gıdalar, bebek formülleri, devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek gıdaları olarak sınıflandırılmıştır. TGK Bebek ve Küçük Çocuklara Yönelik Gıdalar ile Vücut Ağırlığı Kontrolü için Diyetin Yerini Alan Gıdalar Yönetmeliği'ne göre, on iki ayın altındaki yaş grubu "bebek" olarak tanımlanmıştır. Bebek formülleri, bebeklerin yaşamlarının ilk ayları boyunca kullanılması amaçlanan ve uygun tamamlayıcı beslenme başlayıncaya kadar tek başına bebeklerin ihtiyaçlarını karşılayan gıdalardır. Devam formülleri ise, uygun tamamlayıcı beslenmenin başlamasının ardından bebeklerin ve küçük çocukların tüketmesi için hazırlanan ve giderek çeşitlenen diyetlerine ve sıvı alımına katkı sağlayan gıdalar olarak ifade edilmektedir. Yine, aynı yönetmeliğe göre, 12 ay ile 36 ay yaş grubu ise küçük çocuk olarak kabul edilmektedir. Bebek ve küçük çocuk beslenmesinde kullanılan ek gıdalar, işlenmiş tahıl bazlı ek gıdalar ve tahıl bazlı olmayan ek gıdalar olarak belirtilmiştir (Anonim 2019a, 2019b).

2.1. Bebek Maması Tanımı ve Genel Özellikleri

Yeni doğan bebeklerin beslenmesinde en uygun besin kaynağı anne sütü olmakla birlikte (WHO 2021b), anne sütünün yetersiz olduğu ya da birtakım nedenlerden dolayı anne sütü ile beslemenin sekteye uğradığı durumlarda bebek mamaları alternatif bir kaynak olarak kullanılabilir (Dalkılıç Kaya 2011, Pei ve ark. 2018, Vural ve Genç 2022).

Bebek mamaları normal süt çocuklarının beslenme gereksinimlerini sağlayan, gerekli durumlarda anne sütü yerine kullanılabilen ve bileşimleri anne sütünün bileşimine yakın olan sıvı veya toz halinde hazırlanan ürünlerdir (Seyrekbasan 2000).

Bebek gelişiminde anne sütü ile beslemenin en faydalı beslenme şekli olduğu uzun süredir bilinmesine rağmen, insanlar anne sütüne alternatifler arayarak, bu amaçla sütannelerinden de faydalanılmıştır. Sütannelerinin bebeklere hastalık bulaştırma risklerinin yanı sıra, endüstriyel gelişim ile birlikte sütannelerin maddi açıdan getirisi daha yüksek olan işlerde çalışmaya başlaması sonucunda bebek beslenmesinde ek besin kullanımında ciddi bir artış ortaya çıkmıştır (Barness 1985, Seyrekbasan 2000).

Mamaların geliştirilmesinde anne sütü ve hayvan sütü bileşimlerinin belirlenmesi önemli rol oynamıştır. Yapılan analizler sonucunda, anne sütünün protein içeriğinin hayvan sütlerindeki protein içeriğinden oldukça az olduğu belirlenmiştir. Bu amaçla, inek sütünü içerik olarak anne sütüne benzetmek amacıyla ilk başlarda inek sütü sulandırılarak bebeklere verilmiştir. İnek sütü sulandırılmadan bebeklere verildiğinde, sindiriminin daha güç olduğu ve protein intoksikasyonuna bağlı olarak bebek ölümlerinin meydana geldiği görülmüştür. İnek sütünün sindirilebilirliğini kolaylaştırmak amacıyla, inek sütü proteinlerinin ısı ile denatürasyonu yaygın olarak kullanılan bir yöntem olup, ayrıca laktik asit ilavesi de sütü seyreltmek amacıyla kullanılabilir (Barness 1985, Seyrekbasan 2000).

İlk bebek maması Henri Nestle tarafından 1860 yılında üretilmiştir. Bebek maması üretimine, İsviçre’de çalışan annelerin bebeklerin beslenmesi ile yeterince ilgilenememesi ve bunun sonucunda bebek ölümlerinin artması neden olmuştur. “Farine Lactee” adı verilen bu mama tahıl karışımı ve inek sütü ilavesi ile üretilmiştir (Dalkılıç Kaya 2011).

Modern anlamda ilk bebek maması ise, 1915 yılında Gerstenberger tarafından hazırlanmıştır. Bu mama anne sütüne benzetilerek hazırlanarak, 300 bebek üzerinde

denenmiş olup, günümüzde kullanılan mamaların öncüsü olarak kabul edilmektedir (Anderson ve ark. 1982, Barness 1987).

2.2. Bebek Maması Üretimi

Bebek mamaları, kullanım amacına göre, üç farklı grup altında sınıflandırılabilir. Birinci grupta, başlangıç ve devam formülleri yer almakta olup, başlangıç formülleri doğumdan itibaren 4-6. aya kadar kullanılabilen, devam formülleri ise 4. ayını tamamlamış bebekler için geliştirilmiş formüllerdir. İkinci grup, özel amaçlı üretilen mamaları (prematüre, çok düşük kiloyla doğan bebekler için hazırlanmış ya da diyare durumlarında kullanılan özel formüller) kapsamaktadır. Üçüncü grupta ise, hazır ek besinler olarak bilinen ve kavanozlarda tüketime sunulan kaşık mamaları bulunmaktadır (Seyrekbasan 2000, FAO/WHO 2004, Vural ve Genç 2022). Bebek mamalarının bileşimi kullanım yaşına göre değişmekle birlikte, genel olarak, yağsız süt ve kurutulmuş süt ürünleri (yağsız süt tozu, peynir altı suyu tozu), laktoz, bitkisel ve hayvansal yağlar (balık yağı), nişasta, vitamin, mineral, emülgatör ve stabilizatörleri içerir (Gökçay ve ark. 2012).

Toz bebek formülleri, kurutulmuş süt ürünleri ve tıbbi amaçlı kullanılan diğer gıdalar benzer teknikler kullanılarak üretilmektedir. Üretimde ilk aşama içeriğin karıştırılması olup, bu amaçla üç farklı yöntem kullanılmaktadır (FAO/WHO 2004, Dalkılıç Kaya 2011). Hammaddeler ile katkı maddeleri karıştırıldıktan sonra, karışım pastörize edilmektedir. Pastörizasyondan sonra, homojenizasyon ile yağ, vitamin ve mineral içeriği yönünden standardizasyon işlemi yapılmaktadır. Bundan sonra, uygun paketlenme yöntemi ile paketlenerek, ısı işlemi (sterilizasyon) uygulanmaktadır. Son aşamada ise, sprey kurutma işlemi yapılmaktadır (Becker ve ark. 1994, Gökçay ve ark. 2012).

A) Islak Karıştırma: Bu aşamada, işlenmemiş durumdaki hammaddeler ile işlenmiş durumdaki katkı maddeleri bir araya getirilerek, sıvı haldeki ara ürün olarak ısı işlemine (pastörizasyon ya da sterilizasyon) tabi tutulur. Isı işlemi, 71.6 °C'de 15 sn, 74.4 °C'de 25 sn (özellikle nişasta ve kıvam arttırıcılar kullanıldığında) ya da daha yüksek sıcaklıklarda 105-125 °C'lerde en az 5 sn olarak uygulanır. Bu aşamada uygulanan ısı işlemi ile *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan bakterilerin etkin bir şekilde yıkımlandığı kabul

edilir. Ardından karışım homojenize edilir, evaporasyonla konsantre edilir, kurutulur ve son olarak, dolum işlemi gerçekleştirilir. Vitaminler kurutma aşamasından önce ilave edilerek, ısı işlemi ve kurutma aşamasından sonra herhangi bir katkı maddesi eklenmemektedir.

B) Kuru Karıştırma: Her bir katkı maddesi ayrı bir şekilde işlenerek, kuru formda bir araya getirilip karıştırılarak, son ürüne ulaşılır ve dolum yapılarak işlem sonlandırılır.

C) Kombine İşlemler: Bu metotta, işlenmemiş durumdaki hammaddeler ile katkı maddelerinin bir bölümü ıslak karıştırma işlemine tabi tutulur. Buradaki amaç, temel toz karışım elde etmektir. Temel toz karışım bir ara ürün olup, bu toz karışım daha sonra farklı ürünlerin üretilmesinde kullanılır. Sonraki adımda, ayrıca işlenmiş katkı maddeleri farklı formülasyonlarda bu temel toz karışımına ilave edilir. Bu işlem homojen bir karışım elde etmek amacıyla gerçekleştirilir. Partiler halinde yapılır ve katkı maddelerinin çeşidine göre, farklı mikser tipleri kullanılarak işlenir ve ardından paketlenir (FAO/WHO 2004, Dalkılıç Kaya 2011).

Özet olarak, süt bazlı bebek mamalarının üretiminde sırasıyla pastörizasyon, konsantrasyon ve kurutma işlemleri uygulanmaktadır. Kurutma işleminden önce, içeriğin kuru maddesi % 45-50 olacak şekilde evaporasyon yöntemi ile konsantre edilmektedir. Bebek mamaları üretiminde hazırlanan karışımlara paketlenme öncesi pastörizasyon ve paketlenme sonrası sterilizasyon işlemleri uygulanmaktadır. Paketlenme öncesi pastörizasyon 88-95°C'de 15-30 saniye süresince, paketlenme sonrası sterilizasyon ise 118°C'de 10-15 dakika veya 142 °C'de 2-3 saniye süresince uygulanmaktadır (Gökçay ve ark. 2012, Stoeckel ve ark. 2013, Vural ve Genç 2022). Bu işlemlere rağmen, bebek ve çocuk mamaları ile hazır ek gıdalar steril ürünler olarak değerlendirilmemektedir, çünkü üretim tekniği ile bileşimine giren maddelerin kompleks yapısından dolayı rekontaminasyon meydana gelebilmektedir, ancak yasal olarak mikrobiyolojik kriterlere uygun olmaları gerekmektedir (Pei ve ark. 2018).

Yapılan çalışmalar, bebek mamaları ile bebek ve çocuk beslenmesinde kullanılan ek gıdaların üretimi sırasında uygulanan ısı işleminin, ham maddede bulunma potansiyeli olan patojen bakterilerin vejetatif formlarını yıkımlayabildiği, ancak spor formlarının inaktive olmadığını ve canlılığını sürdürebildiğini göstermektedir. Ayrıca, bebek mamalarının

içeriğinde bulunan, süt ve kurutulmuş süt ürünleri ile nişasta mikroorganizmalar için uygun bir besiyeri olmaktadır. Dolayısıyla, hijyenik ve uygun olmayan koşullarda üretim ile depolama ve hazırlama aşamasındaki olası kontaminasyonlar bu gıdaları mikrobiyolojik açıdan daha tehlikeli hale getirmektedir (Shadlia-Matug 2008, Bahçeci ve ark. 2018, Genç ve Vural 2021).

Gıdaların mikrobiyolojik ya da kimyasal nedenlerden dolayı kirlenmesi sonucunda ortaya çıkan gıda kaynaklı hastalıklar tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (Rahimi ve ark. 2013). Gıda kaynaklı infeksiyonlar yeni doğanlarda ve çocuklarda ciddi seyirli ve ölümcül olabilmektedir. Dünyada tahmini olarak 600 milyon kişi kontamine gıda tüketimi sonucunda hastalanmakta ve buna bağlı olarak, her yıl 420 bin kişi hayatını kaybetmektedir. Bu durumdan en fazla etkilenen grup ise 5 yaşının altındaki çocuklar olup, her yıl gıda kaynaklı hastalıklara bağlı olarak 125 bin çocuk hayatını kaybetmektedir (WHO 2022).

Yapılan çalışmalar, bebek mamalarının çevresel kaynaklı patojen mikroorganizmalarla kontaminasyonunun enfeksiyona bağlı bebek ölümlerine neden olabileceğini göstermektedir (Bahçeci ve ark. 2018, Genç ve Vural 2021). Bunun en önemli nedeni, bebek ve çocuklarda immunolojik savunma mekanizmalarının ve bağırsak florasının tam olarak gelişmemiş olması, dolayısıyla gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarına karşı daha duyarlı olmalarıdır (WHO 2022).

Bebek ve küçük çocuk beslenmesinde kullanılan gıdalarda bulunabilecek mikroorganizmalar, Dünya Sağlık Örgütü ile Gıda ve Tarım Örgütü tarafından 3 farklı kategoride incelenerek, A kategorisinde bebeklerde enfeksiyona neden olduğu kesin olarak bilinen *Cronobacter sakazakii* ve *Salmonella enterica*, B kategorisinde koliform grubu bakteriler, C kategorisinde ise *B. cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* bulunmaktadır (FAO/WHO 2004). Ayrıca, bebek formüllerinin mikrobiyolojik yönden güvenilirliği ile kontaminasyon düzeyinin belirlenmesinde *B. cereus*'un bir indikatör olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Pei ve ark. 2018).

B. cereus, başta toprak olmak üzere, çevrede yaygın olarak bulunan bir mikroorganizmadır. Endospor oluşturan bir bakteri olup, spor formunda olumsuz çevre koşullarına karşı dirençli olup, uzun süre canlılığını sürdürebilmektedir. Genellikle tahıl

(özellikle pirinç), baharat, sebze, süt ve ürünleri, et ve ürünleri gibi birçok gıdanın kontaminasyonu sonucunda, insanlarda gıda kaynaklı zehirlenmelere yol açabilmektedir. Gıda kaynaklı *B. cereus* intoksikasyonlarında ortaya çıkan semptomların hafif, kısa süreli ve kendini sınırlayan özellikte olması nedeniyle, hastalığın sınırlı düzeyde bildirimi yapılmaktadır (Wong ve ark. 1988, Reyes ve ark. 2007, Stenfors Arnesen ve ark. 2008, Tallent ve ark. 2012, Özarslan ve ark. 2018, Gdoura Ben-Amor ve ark. 2019). *B. cereus* gıda intoksikasyonu ve gastroenteritis dışında, sindirim kanalına kolonize olduktan sonra, fırsatçı bir patojen olarak septisemi, menenjit, selülit, endokardit, endoftalmit, endokardit, osteomyelit ve pnömoni gibi ekstraintestinal infeksiyon ve semptomlara da yol açabilir. Ekstraintestinal infeksiyonlara genellikle bakteri tarafından sentezlenen ve ekzotoksin benzeri olan hemolizinler ile fosfolipazlar neden olmaktadır. *B. cereus*'dan kaynaklı ekstraintestinal infeksiyonlar nadiren gözlenmekle birlikte, bu infeksiyonlara en çok yeni doğanlarda ve immunsistemi baskılanmış kişilerde rastlanılmaktadır (Kotiranta ve ark. 2000, Park ve ark. 2009, Tewari ve Abdullah 2015, Zhang ve ark. 2016, Liu ve ark. 2020).

2.3. *B. cereus*'un Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri

Filogenetik sınıflandırmada, *B. cereus*, *Bacilli* sınıfının *Bacillales* takımında ve *Bacillaceae* familyasında yer almaktadır. Bu familyaya bağlı *Bacillus* genusu kompleks bir yapıya sahip olup, ilk kez Cohn tarafından 1872 yılında tanımlanmıştır. Taksonomik olarak, bu genusta yer alan *B. cereus* grubu (ayrıca *B. cereus sensu lato* olarak da bilinmektedir), *B. albus*, *B. anthracis*, *B. bombysepticus*, *B. cereus*, *B. nitratreducens*, *B. pacificus*, *B. paramycoides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus*, *B. pseudomycoides*, *B. samanii*, *B. thuringiensis*, *B. cytotoxicus*, *B. tropicus*, *B. wiedmannii*, *B. toyonensis*, *B. gaemokensis*, *B. luti*, *B. manliponensis*, *B. mobilis*, *B. mycoides* olmak üzere, 21 adet *Bacillus* türünü içermektedir (Schoch ve ark., 2020). *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* ve *B. thuringiensis*'in 16S rRNA yapısında % 99'un üzerinde bir sekans benzerliği olduğu belirtilmiştir (Kotiranta ve ark. 2000).

Bacillus genusuna ait bakteriler çomak formunda, endospor oluşturan değişik çevresel kaynaklarda bulunabilen bakterilerdir. *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* ve *B. weihenstephanensis* insan ve hayvanlarda hastalık

oluşturan önemli türler arasında yer almaktadır. Bu türler çerisinde gıda kaynaklı intoksikasyonlarda sıklıkla izole edilen türün *B. cereus* olduğu bildirilmektedir (Schneider ve ark. 2004, Stenfors Arnesen ve ark. 2008, Tewari ve Abdullah 2015).

B. cereus Frankland ve Frankland tarafından 1887 yılında izole edilerek tanımlanmıştır (Frankland ve Frankland 1887). 20. yüzyılın başlarında Avrupa'da *B. cereus*'un neden olduğu gıda kaynaklı hastalıklara ilişkin raporlar olmasına rağmen, *B. cereus*'un gıda zehirlenmesine neden olabileceği kesin olarak kanıtlanmamıştır. Norveç'te 1947-1949 yılları arasında vanilya sosu tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan ve diyare ile seyreden bir salgında *B. cereus* izole edilerek, gıda intoksikasyonu etkeni olarak ilk kez tanımlanmıştır (Hauge 1955). Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da, *B. cereus*'a bağlı gıda zehirlenmesi ilk olarak 1968 yılında literatüre geçmiştir (Tewari ve Abdullah 2015).

B. cereus, Gram pozitif, hemoliz yapan (genellikle β -hemolitik) ve endospor oluşturma yeteneğine sahip bir bakteridir. Bunun yanı sıra, 3-5 μ m uzunluğunda olup, 1.0-1.2 μ m genişliğinde çomak formunda bir mikroorganizmadır. Genellikle peritrik flagelları ile hareketli olup, ancak hareketli olmayan suşları da tanımlanmıştır. Aerob ve fakültatif anaerob koşullar altında üreyebilir. Lesitinaz ve katalaz pozitifdir. Glikozu fermente ederek asit oluşturur, ancak mannitolü fermente edemez (Granum ve Lund 1997, Kotiranta ve ark. 2000, Stenfors Arnesen ve ark. 2008, Park ve ark. 2009, Tallent ve ark. 2012, Abraha ve ark. 2017).

Etken mezofilik özellikte olup, 10-48 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilmekte ve optimum üreme sıcaklığı ise 28-35 °C'ler arasındadır. Psikrotrofik suşları 7 °C'nin altında üreyebilmektedir. Üremesi için optimal pH değeri 6.0-7.0 olmakla birlikte, pH değeri 4.9-9.3 aralığında gelişip canlılığını sürdürebilmektedir. Minimum su aktivite değeri (a_w) 0.91-0.93 olup, genel olarak % 7.5 tuz içeren ortamlarda üreyebilmektedir (Schneider ve ark. 2004, Tewari ve Abdullah 2015, Sağlam ve Şeker 2016, Abraha ve ark. 2017, Yurdakul ve ark. 2018).

Diğer *Bacillus* türlerinde olduğu gibi, *B. cereus*'un tipik olarak vejetatif hücre ve spor formu vardır. Vejetatif hücre yapısında, hücre içeriği (sitoplazma), sitoplazmik bir membran ve hücre duvarı ile kuşatılmıştır. Bazı *B. cereus* suşlarında ise hücre duvarının en dış katmanı ayrıca bir yüzey protein tabakası (S-tabakası) içerir ve bu tabaka hücrenin stabil olmasını sağlar (Kotiranta ve ark. 2000). Endosporları elips şeklinde olup, hücre merkezinde ya da

merkeze yakın olarak bulunur ve bakterinin olumsuz koşullara karşı daha dirençli olmasını sağlamaktadır. Sporların germinasyonu için, gerekli optimum sıcaklık 30 °C, minimum sıcaklık -1 °C ve maksimum sıcaklık 59 °C'dir. *B. cereus* sporları pastörizasyon, dondurma, kurutma ve radyasyona karşı dirençli olmakla beraber, spor formunda metabolik aktivite göstermeden yıllarca canlılıklarını sürdürebilmektedir. Dolayısıyla, spor formu *B. cereus*'un çevreye yayılmasında ve gıdalarda bulunmasında önem taşır (Kotiranta ve ark., 2000; Logan, 2012; Özarslan ve ark., 2018; Yurdakul ve ark., 2018). *B. cereus* özellikle pastörize ürünlerde pastörizasyon sonrasında da sıklıkla bulunabilen bir gıda patojeni olarak bildirilmektedir (Rahimi ve ark. 2013, Pei ve ark. 2018).

2.4. *B. cereus*'un Toksik Özellikleri

B. cereus önemli bir fırsatçı patojen olarak kabul edilmektedir (Logan 2012, Pei ve ark. 2018). Emetik sendrom (intoksikasyon) ve diyarel sendrom (toksiinfeksiyon) olmak üzere, iki farklı gıda kaynaklı infeksiyona neden olur (Çizelge 2.1) (Kotiranta ve ark. 2000, Stoeckel ve ark. 2013). Bu amaçla, diyarel ve emetik tipte iki farklı toksin üretir. Diyarel enterotoksinler, diyarel sendromdan sorumlu ve ısıya duyarlı olup, bakteri tarafından intestinal kanalda gelişirken oluşturulmaktadır. Emetik toksin gıdalarda sentezlenmektedir. Diyarel form, diyare ve abdominal ağrı ile karakterize olup, kontamine gıda tüketiminden 8-16 saat sonra, emetik form ise kontamine gıda tüketiminden 1-5 saat sonra mide bulantısı ve kusma ile seyreder. Her iki sendromda da hastalık genellikle 24 saatten az sürer. Bazı hastalarda semptomlar daha uzun sürebilir (Te Giffel ve ark. 1997, Granum ve Lund 1997, Agata ve ark. 2002, Schneider ve ark. 2004, Reyes ve ark. 2007, Stenfors Arnesen ve ark. 2008, Park ve ark. 2009, Gdoura-Ben Amor ve ark. 2019).

Diyarel sendromdan sorumlu proteinleri, hemolizin BL(Hbl), non-hemolitik enterotoksin (nhe) ve sitotoksin K (cytK) oluşturur (Park ve ark. 2009, Logan 2012). Bu enterotoksinlerin ortak özelliği hedef hücre membranında por oluşturarak, hücre membranına zarar vermeleridir. Bu yolla hedef hücrenin parçalanmasına (lizise) ve hücre ölümüne (apoptoza) neden olurlar (Liu ve ark. 2020).

Hemolitik enterotoksin, Hbl, hblCDA operonu tarafından kodlanır. L1 (36 kDa), L2 (45 kDa) ve B (35 kDa) olmak üzere, 3 protein bileşeninden oluşur. B bağlanma için olup, sırasıyla *hblC*, *hblD* ve *hblA* genleri tarafından kodlanır. L1 ve L2 ise litik bileşenlerdir (Kotiranta ve ark. 2000). Hemolitik olmayan enterotoksin (Nhe) de benzer şekilde üç farklı protein bileşenlerinden (NheA, NheB, NheC) oluşur ve yapısal olarak Hbl'ye benzeyen bir toksindir. NheA (45 kDa) sitolitik özellik gösterirken, NheB (39 kDa) ve NheC (37 kDa) bağlanmayı sağlar. Bu proteinler, *nheA*, *nheB*, *nheC* genleri tarafından kodlanırlar. Norveç'teki bir salgından sonra keşfedilerek, diyareye neden olan önemli toksinlerden olduğu kabul edilmektedir (Tewari ve Abdullah 2015, Zhang ve ark. 2016).

Sitotoksin K (CytK), 34 kDa molekül ağırlığında ve tek bileşenli bir toksin olup, *Clostridium perfringens*'in beta-toksini ile aynı toksin ailesinde yer alır (Park ve ark. 2009, Sánchez-Chica ve ark. 2021). Dermonekrotik, sitotoksik ve hemolitik özellik gösterir. *B. cereus* suşlarının yaklaşık % 90'ının bu toksinin sentezinden sorumlu genleri (*cytK-1*, *cytK-2*) taşıdığı bildirilmektedir (Tewari ve Abdullah 2015).

Çizelge 2.1. *B. cereus*'un neden olduğu emetik ve diyarel sendromun karşılaştırılması (Granum ve Lund 1997, Agata ve ark. 2002, Stenfors Arnesen ve ark. 2008).

Özellikler	Diyarel sendrom	Emetik sendrom
İnfectif doz	10 ⁵ -10 ⁷ kob (total)	10 ⁵ - 10 ⁸ kob/g
Toksinin üretildiği yer	Konakçının ince bağırsağı	Gıda
Toksinin türü ve yapısı	Enterotoksin, protein	Emetik toksin (cereulide), siklik peptid
Toksinin ısıya direnci	60°C 1-2 dk	150°C 60 dk
İnkübasyon süresi	8-16 saat (nadiren 24 saatin üzerinde)	0.5-6 saat
Hastalığın süresi	12-24 saat (bazen birkaç gün)	6-24 saat
Semptomlar	Karın ağrısı, sulu diyare ve bazen mide bulantısı	Mide bulantısı, kusma, halsizlik, bazen diyare
Sorumlu tutulan gıdalar	Proteince zengin gıdalar, et ürünleri, süt ve süt ürünleri, sütlü tatlılar sebzeler, soslar, çorbalar	Niştastalı gıdalar, pişmiş pirinç, makarna, pastacılık ürünleri

Diyarel sendromda infeksiyon dozu 10^5 - 10^7 kob olup, bu düzey gıdadaki canlı bakteri ya da spor sayısına, toksin miktarına ve etkilenen bireyin duyarlılığına göre değişmektedir (Agata ve ark. 2002, Sánchez-Chica ve ark. 2021). Diyarel sendrom *C. perfringens*'in neden olduğu gıda infeksiyonları ile karışabilmektedir (Abraha ve ark. 2017).

Diğer formu, diyarel sendromdan daha şiddetli ve akut olarak seyreden ve kısa inkübasyon periyoduna sahip emetik sendromdur. Emetik sendrom, mide bulantısı, kusma ve karında kramplar ile karakterizedir. İnkübasyon periyodu ve gözlenen semptomlardan dolayı, *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu gıda intoksikasyonuna benzer. (Tewari ve Abdullah 2015, Abraha ve ark. 2017). Bu sendromdan sorumlu toksin 'emetik toksin (cereulide)' olarak nitelendirilir ve plazmid üzerinde yer alan *ces* geni tarafından kodlanır (Sánchez-Chica ve ark. 2021). Molekül ağırlığı 1.2 kilo Dalton (kDa) olup, ısıya, aside ve proteolizise dayanıklı siklik bir peptittir ve bu özelliği sayesinde gastrointestinal sistemde aktivitesini sürdürür (Zhang ve ark. 2016, Gdoura Ben-Amor ve ark. 2019). Yeterli düzeyde emetik toksinin sentezlenmesi için, gıdada vejetatif hücre sayısının 10^5 - 10^8 kob/g'a ulaşması gerekir (Granum ve Lund 1997). Bu toksin hücrede mitokondri fonksiyonunu etkileyerek ve RNA sentezini inhibe ederek hücreye zarar verir. Duyarlı hücrelerin (hepatositler) protoplazmasında vakuol oluşumu ve granüler dejenerasyon sonucunda, karaciğer hasarı meydana gelir (Liu ve ark. 2020). Ayrıca *B. cereus* suşlarının çoğunlukla *entFM* geni tarafından kodlanan enterotoksin FM (ent FM)'yi üretebildikleri bildirilmiştir (Logan 2012, Rahimi ve ark. 2013, Sánchez-Chica ve ark. 2021).

2.5. *B. cereus*'un Gıdalarda Bulunuşu

Bacillus soyundaki bakteriler ubiquiter özellikte olup, kompleks besin gruplarına gereksinim duymadan doğada rahatlıkla gelişebilirler (Kotiranta ve ark. 2000, Logan 2012). *B. cereus* esasen bir toprak saprofiti olup, kontamine bir toprağın gramında 10^3 - 10^5 düzeyinde etkenin spor formu bulunabilir (Tewari ve Abdullah 2015). Başta bitkisel gıdalar olmak üzere, çok farklı gıda ve ürünlerinde (pirinç, süt ve ürünleri, et, baharat, sebze, kurutulmuş gıdalar) bulunarak, çapraz kontaminasyon sonucunda vejetatif formu ya da

sporları çevreye, diğer gıdalara geçiş yapabilir (Granum ve Lund 1997, Zhang ve ark. 2016, Berthold-Pluta ve ark. 2019).

B. cereus rekabetçi yeteneği zayıf bir bakteri olmasına rağmen, etkeni gıda zincirinden tamamen elimine etmek zor olmaktadır. Gıdalara uygulanan ısı işlemi yarışmacı floranın baskılanmasına, *B. cereus* sporlarının germinasyonuna neden olmaktadır (Granum ve Lund 1997). *B. cereus* sütü sıklıkla kontamine ederek, süt ve ürünlerinde kusurlara yol açar (Ahmed ve ark. 1983, Wong ve ark. 1988). Etkenin sporları süte toprak, altlık, yem, sağım ekipmanından bulaşır ve pastörizasyondan sonra canlı kalarak, uygun koşullarda germine olabilirler (Stenfors Arnesen ve ark. 2008, Stoeckel ve ark. 2013, Liu ve ark. 2020). Ayrıca, sporları hidrofobik özellikte olup, alet ve ekipman yüzeylerine tutunarak özellikle süt işletmelerinde sorun oluşturmaktadır (Kotiranta ve ark. 2000, Logan 2012). Psikrotrofik özelliği sayesinde soğukta muhafaza edilen süt ve ürünlerinde gelişerek, proteinaz, lipaz gibi birtakım ekstraselüler enzimler salgılar ve bozulmaya neden olur (Te Giffel ve ark. 1997, Abraha ve ark. 2017). Sporları UHT (Ultra-High-Temperature) steril süt üretiminde yıkımlanabilmekte, ancak lipolitik ve proteolitik enzimleri tamamen inhibe edilememektedir. Oda sıcaklığında aktive olan bu enzimler pastörize ve UHT-sütlerde bozulmaya neden olabilir (Özdemir 2003, Sağlam ve Şeker 2016).

Kurutulmuş süt ürünlerinin *B. cereus* ile kontaminasyonu ise genellikle hammadde süttten kaynaklanır, çünkü etken düşük düzeylerde de olsa çiğ sütte bulunmaktadır. Dolayısıyla, kontamine süt ve ürünlerinin gıda endüstrisinde bir bileşen olarak kullanılması ile *B. cereus* son ürüne geçebilmektedir (Wong ve ark. 1988).

Kurutulmuş süt ürünleri sıklıkla *B. cereus* sporlarını içerebilmekte olup (Becker ve ark. 1994), bu ürünlerin temel bir bileşen olarak kullanıldığı bebek mamalarında *B. cereus*'un başlıca kirletici etken olduğu bildirilmiştir (Rahimi ve ark. 2013). Bu tip ürünlerde normal şartlarda sporların germinasyonu gerçekleşmemekle birlikte, toz halindeki bu ürünlerin sulandırılarak hazırlanması (rekonstitüe) ve hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında bekletilmesi sonucunda mevcut sporlar germine olarak vejetatif hale geçebilmektedir. Vejetatif hücrelerin çoğalarak, toksin sentezlenmesi genellikle psikrotrofik özellikteki *B. cereus* suşları ile ilişkilendirilerek, bu suşların buzdolabı sıcaklığında (7 °C'nin altında) üreyebilmesi sonucunda gerçekleştiği bildirilmiştir (Reyes ve ark. 2007).

Süttozundan izole edilen sporların fosfat tamponu içinde $D_{100^{\circ}\text{C}}$ değeri 2.2-5.4 dk arasında değişirken, sütteki tüm *B. cereus* sporlarının inaktivasyonu için gerekli ısı-zaman kombinasyonu 125°C 'de 10-20 sn olarak belirtilmektedir (Becker ve ark. 1994). Sprey kurutma yöntemi ile üretilen toz halindeki bebek formülü gibi konsantre ürünlerde sporların uygulanan ısı işlemine karşı artan bir direnç gösterme eğiliminde olduğu ve bu ürünlerde D-değerinin yükseldiği gözlenmiştir (Stoeckel ve ark. 2013).

B. cereus'a bağlı gıda infeksiyonları kısmen hafif seyretmekte ve genellikle 24 saatten daha az bir süre içerisinde sona ermektedir. Buna bağlı olarak, *B. cereus*'un neden olduğu gıda infeksiyonları düşük düzeylerde rapor edilmektedir (Abraha ve ark. 2017, Gdoura-Ben Amor ve ark. 2019). Ancak, diyarel ve emetik tip toksinlerinin neden olduğu ciddi seyirli ve ölümle sonuçlanabilen gıda infeksiyonları da resmi olarak bildirilmiştir (Granum ve Lund 1997, Stenfors Arnesen ve ark. 2008).

B. cereus ile kontamine gıdaların pişirilmesinde yetersiz ısı işleminin uygulanması, pişirildikten sonra hızlı soğutulmaması ile oda sıcaklığında uzun süre bekletilmesi sonucunda, inaktive olmayan sporlar germine olarak çoğalabilmektedir. Yapılan araştırmalarda, gıdadaki vejetatif hücre sayısının $>10^5$ kob/g'a ulaşması sonucunda, gıda zehirlenmesinin meydana geldiği belirtilmektedir (Ahmed ve ark. 1983, Zhang ve ark. 2016, Sağlam ve Şeker 2016, Gdoura-Ben Amor ve ark. 2019).

B. cereus ile ilgili gıda zehirlenmelerinde sorumlu tutulan gıdalar arasında makarna, pilav, et ve ürünleri, süt ve ürünleri, sebze yemekleri, patates püresi, çeşitli çorbalar, pudingler, baharat ve soslar yer alır. Bunların içerisinde kızartılmış ya da pişirilmiş pirinç, şehriye, pizza hamuru ve makarnalar genellikle emetik sendroma, mısır ve tahıl içeren gıdalar, patates püresi, sebzeler, kıyma, puding, soslar ve çorbalar ise genel olarak diyarel tip sendroma sebep olur (Te Giffel ve ark. 1997, Sağlam ve Şeker 2016).

2.6. Gıda Kaynaklı *B. cereus* İntoksikasyonları ve Önlenmesi

B. cereus, pişmiş sebzeler ve etler, haşlanmış veya kızarmış pirinç, vanilya sosu, kremalar, çorbalar, dondurma, çiğ bitkisel gıdalar ve baharatlar dahil olmak üzere, gıda infeksiyonu ile ilişkili geniş bir gıda yelpazesine sahiptir. Bu gıdaların birçoğu *B. cereus*

içerebilir, çünkü etkenin sporları ısıya dayanıklı olup, pişirme esnasında canlılığını devam ettirir. Yapılan çalışmalar, *B. cereus* sporlarının önerilen pişirme sıcaklıklarında bile canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir (Schneider ve ark. 2004, Logan 2012). *B. cereus* sporları ısıya son derece dayanıklı oldukları için, gıdaların uygun sıcaklıklarda iyi pişirilmesi *B. cereus*'un vejetatif formları olmak üzere, gıda kaynaklı birçok patojeni yok ederken, sporlar ise yıkımlanmamaktadır. Dolayısıyla, pişirilmiş gıdalar hemen tüketilmeyecekse, oda sıcaklığında 2 saatten fazla bekletilmemeli ve hızla soğutularak 7 °C'nin altındaki sıcaklıklarda muhafazaya alınmalıdır (WHO 2006, Tewari ve Abdullah 2015).

Gıdalar yeterli düzeyde pişirilip, pişirildikten sonra sıcak olarak servis edildiği takdirde güvenilir kabul edilmektedir. Pişirme işlemi 100°C'nin altında yapıldığında sporlar canlılığını korur. Çünkü, bu derecelerde sporlar germine olur ve bakterinin vejetatif formları çoğalarak infektif düzeylere ulaşabilir. Yeniden ısıtılacak gıdalar ile gıdaların sıcak olarak servis edilmesi durumunda, gıdanın sıcaklığının 60°C'nin üzerinde olmasına dikkat edilmelidir. Spor formların germinasyonu, sıcaklığın düşürülmesi ya da pH ve a_w uygulamaları ile önlenebilmektedir. UHT teknolojisi ile bütün vejetatif ve spor formları inaktive edilmektedir. (WHO 2006, Logan 2012, Sağlam ve Şeker 2016).

B. cereus sporları kurutmaya karşı da dirençli olup, bu sayede süt tozu ve un, nişasta, pirinç gibi kuru formdaki tahıl bazlı ürünlerde canlılığını devam ettirebilmektedir (Logan 2012). Bu nedenle, tahıl bazlı ürünlerden hazırlanan bebek ve küçük çocuk gıdaları küçük porsiyonlar halinde ve her defasında taze olarak hazırlanmalı, artan gıdalar ise tekrar bebek ve çocuklara verilmemelidir. Bebek ve küçük çocuk beslenmesinde kullanılan toz formundaki mamalar pişirilerek ya da pişirilmeden hazırlanabilmektedir. Bu kapsamda, toz formundaki mamalar özellikle pişirilmeden belli oranda su ile karıştırılarak hazırlandığında, kullanılan suyun hijyenik kalitesi de önemli olup, kaynatılmış su bu amaçla kullanılabilir.

Özetle, *B. cereus*'un neden olduğu gıda kaynaklı intoksikasyonlardan korunmada, gıdaları yüksek buhar basıncında pişirmek, kızartmak ve ızgara yapmak etkenin vejetatif ve spor formlarını yok edebilir. Ancak, etkenin emetik toksini ısıya dirençli olup, bu toksini içeren gıdaların 126.1 °C'de 90 dk süre ile ısıtılması gerekir (Schneider ve ark. 2004). Gıdaların hazırlanması sırasında rekontaminasyon ve çapraz kontaminasyonun engellenmesi için, personel hijyeni de önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada, bebek ve çocuk beslenmesinde kullanılan farklı firmalara ait orijinal ambalajında 30 adet toz formundaki bebek maması (20 adet ithal, 10 adet yerli mama), 25 adet cam kavanozda konserve formundaki mama ile 25 adet tahıl bazlı ürün (açık veya ambalajlı olarak satılan un, nişasta, pirinç unu ve irmik) olmak üzere, toplam 80 adet örnek materyal olarak kullanıldı. Örnekler, Mart-Nisan-Mayıs 2021 tarihlerinde Hatay ve Mersin illerindeki farklı süpermarketlerin reyonlarından aseptik koşullarda toplanarak, analize alındı. Bebek mamalarının öncelikle ambalaj kontrolleri yapılarak, ürünün cinsi, kabaca bileşimi, üretim tarihi, son kullanma tarihi, parti numarası ile markası kaydedildi ve ticari firma adları gizli tutularak her bir örneğe bir numara verildi.

3.1.1. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Kimyasal Maddeler

Çalışmada, *B. cereus*'un izolasyonunda ön zenginleştirme aşamasında Tryptic Soy Broth (Merck 1.05459.0500), supplement olarak 10 mg/ml konsantrasyonda Polimiksin B (Sigma, P-1004, USA), katı besiyeri olarak Brilliance *Bacillus cereus* Agar Base (Oxoid, CM1036) ve selektivite için, Brilliance *Bacillus cereus* selektif supplement (Polimiksin B 53,000 IU+ Trimetoprim 5 mg, Oxoid, SR0230E), Tryptone Soya Agar (Oxoid CM0131) ve kanlı agar (% 7 koyun kanı içeren) kullanıldı. Elde edilen izolatların ileri analizler için aktive edilmesi amacıyla, Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM1135) ve doğrulanan izolatların -20 °C'de stoklanması için % 15'lik konsantrasyonda Gliserinli-Brain Heart Infusion Broth hazırlanarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm katı ve sıvı besiyerleri, ticari firmanın etiketinde belirttiği yöntem esas alınarak hazırlandı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika 1 atmosfer basınçta sterilize edilerek kullanıldı. Supplementler besiyerlerine sterilizasyonu takiben 50 °C'ye soğutulduktan sonra ilave edildi.

3.1.2. Moleküler Analizlerde Kullanılan Malzemeler

Primerler

Wang ve ark. (1997), Ehling-Schulz ve ark. (2005) ve Ehling-Schulz ve ark. (2006) tarafından önerilen primer çiftleri (Çizelge 3.1) HPLC saflıkta sentezletildi. Liyofilize olarak temin edilen primerler (Ella Biotech GmbH, Deutschland) üretici firmanın önerdiği miktarlarda Dnaz/Rnaz içermeyen saf su (Thermoscientific, R0581) ile son konsantrasyon 100 pmol/μl olacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan stok primer solüsyonundan 10 μl alınarak, üzerine 90 μl saf su eklenerek, ayrı bir ependorf tüpüne 1/10 oranında sulandırma ile 10 pmol/μl konsantrasyondaki primerler çalışmada kullanıldı. Hazırlanan primerler -20 °C’de muhafaza edildi.

Çizelge 3.1. Primer çiftleri ve ampikon büyüklükleri.

Hedef gen	Primer sekansı (5’- 3’)	Ampikon 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	Ehling-Schulz ve ark.(2006)
<i>nhe</i>	NA2 F, AAG CIG CTC TTC GIA TTC NB1 R, ITI GTT GAA ATA AGC TGT GG	766	
<i>cytK</i>	CK F2, ACA GAT ATC GGI CAA AAT GC CK R5, CAA GTI ACT TGA CCI GTT GC	421	
<i>ces</i>	CesF1, GGTGACACATTATCATATAAGGTG CesR2, GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	1271	Ehling-Schulz ve ark. (2005)

Taq DNA polymerase (Thermoscientific, EP0402)

5 U/μl konsantrasyonda temin edildi ve -20 °C’de muhafaza edildi.

dNTP mix (EURx, ES0501-01, Poland, 200 μl)

10 mM konsantrasyonda dATP, dGTP, dCTP, dTTP içeren karışım halinde temin edildi ve -20 °C’de muhafaza edildi.

MgCl₂ Solüsyonu (Thermoscientific, 00201718)

25 mM konsantrasyonda ve 1 ml hacimde temin edildi ve -20 °C’de muhafaza edildi.

10X ViBuffer A (Vivantis, RB0201)

1 ml’lik hacimde olup, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (20°C’de pH 9.1) ve % 0.1 Triton X-100 içermektedir. -20 °C’de muhafaza edildi.

6X Jel Yükleme Solüsyonu (Sigma-Aldrich, G7654)

6X konsantrasyonda temin edilen stok jel yükleme solüsyonundan steril bir ependorf tüpüne 10 µl alınarak, üzerine 50 µl steril distile su eklenerek, 1X konsantrasyonda jel yükleme solüsyonu elde edildi ve -20 °C’de muhafaza edildi. Agaroz jel elektroforezinde amplikonların boyanmasında kullanıldı.

Atlas Star 100 bp DNA Ladder Express (Bioatlas, BA01302)

500 µl’lik hacimde olup, 100 aplikasyona ve direkt jele yüklemeye uygun olarak temin edildi ve -20 °C’de muhafaza edildi.

10X TBE Elektroforez Tampon Solüsyonu (ThermoScientific, 00204780)

10X konsantrasyonda temin edilen stok TBE solüsyonundan 50 ml alınarak, distile su ile 1 litreye tamamlanıp, 0.5X TBE çalışma solüsyonu elde edildi. Bu solüsyon, 4 °C’de muhafaza edilerek, agaroz jelin hazırlanmasında ve agaroz jel elektroforezinde kullanıldı.

Agaroz (Sigma-Aldrich, A9539)

Agaroz jelin % 1.5’lik konsantrasyonda hazırlanması için, agarozdan 1.8 gram hassas terazi yardımı ile erlenmeyer içerisine tartılarak, üzerine 120 ml 0.5xTBE ilave edilerek, mikrodalga fırında eritildi. Eriyen agaroz 60-70 °C’ye soğutularak, donmadan içerisine 6 µl

nükleik asit boyası (Safeview Classic, Abm, G108) eklendi. Daha sonra, hazırlanan jel tablasına dökülerek, jelin tamamen donması sağlandı.

Proteinaz K (Sigma-Aldrich, P6556-100 mg)

Liyofilize olarak temin edildi. Steril bir ependorf tüpüne hassas terazide 0.02 g tartılarak, üzerine 1 ml steril distile su eklenerek, vortekslenerek iyice çözündürüldü ve -20 °C’de muhafaza edildi. Son konsantrasyonu 20 mg/ml olacak şekilde, DNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

Lizozim (Sigma-Aldrich, L2879-5G, USA)

Liyofilize olarak temin edildi. Steril bir ependorf tüpüne hassas terazide 0.05 g tartılarak, üzerine 1 ml steril distile su eklenerek, vortekslenerek iyice çözündürüldü ve -20 °C’de muhafaza edildi. Son konsantrasyonu 50 mg/ml olacak şekilde, DNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

Nükleik asit ekstraksiyon kiti (Vivantis, GF-BA-100)

DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere, ticari kit temin edildi ve 4 °C’de muhafaza edildi.

Pozitif kontrol

Mikrobiyolojik ve moleküler analizlerde, pozitif kontrol olarak, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu Laboratuvarından temin edilen Liyofilize *Bacillus cereus* suşu kullanıldı.

3.2. Yöntem

Bebek ve çocuk beslenmesinde kullanılan farklı firmalara ait ithal ve yerli toz formundaki bebek maması, cam kavanozda konserve formundaki mama ile tahıl bazlı ürünler (açık veya ambalajlı olarak satılan un, nişasta, pirinç unu ve irmik) laboratuvara ulaştırılarak, *B. cereus* varlığı yönünden analize alındı. Bu kapsamda, örneklerde ilk olarak klasik kültür tekniği ile *B. cereus* izolasyonu (Tallent ve ark. 2012) gerçekleştirildi. Daha sonra, elde edilen izolatlar *B. cereus* yönünden hemolizin geni hedef alınarak PCR yöntemi ile doğrulandı (Wang ve ark. 1997). Doğrulan izolatlarda hemolitik aktivite, psikrotrofik özellik ile diyarel ve emetik toksin genlerinin varlığı araştırıldı.

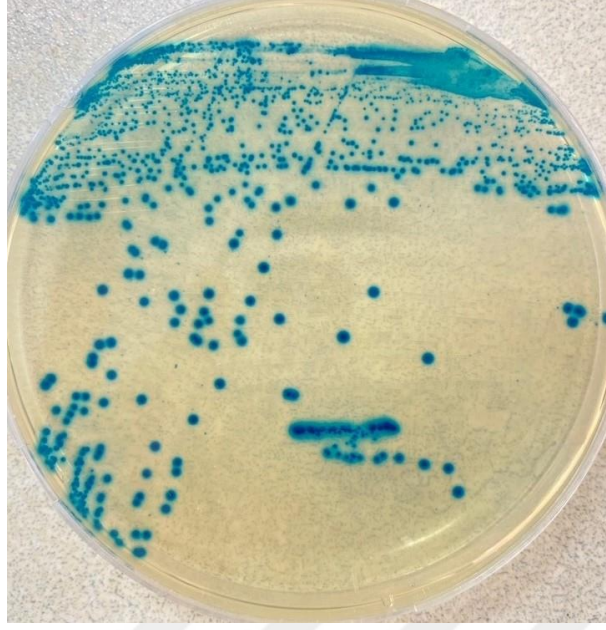
3.2.1. *B. cereus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

3.2.1.1. Ön Zenginleştirme

Ön zenginleştirme için, her bir örnekten 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.

3.2.1.2. Katı Besiyerine Ekim

Ön zenginleştirme yapılan örneklerden bir öze dolusu alınarak, Brilliance *Bacillus cereus* agara çizme plak yöntemi ile ekim yapıldı. Plaklar 30 °C'de aerob koşullarda 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda, agarda turkuaz yeşili renkte pigmentasyon oluşturan koloniler *B. cereus* şüpheli olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. Şüpheli *B. cereus* kolonilerinin katı agardaki görünümü.

3.2.1.3. Hemoliz Yeteneğinin Belirlenmesi

B. cereus'un identifikasyonunda ilave olarak izolatların kanlı agarda hemoliz yapabilme özelliği belirlendi. Bu amaçla izolatlar, içerisinde 4-5 ml Brain Heart Infusion Broth bulunan tüplerde süspanse edilerek, broth kültürü 37 °C'de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Broth kültürlerinden bir öze dolusu alınarak kanlı agara çizme plak yöntemi ile ekim yapıldı ve 37 °C'de 24-48 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, kolonilerin etrafında yeşilimsi ya da berrak bir hemoliz zonunun gelişmesi pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.2. Moleküler Analizler

3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu ticari kitin önerdiği aşamalar sırasıyla uygulanarak yapıldı. Bu amaçla, katı agardan alınan şüpheli *B. cereus* kolonileri, içerisinde 4-5 ml Brain Heart Infusion broth bulunan tüplerde süspanse edilerek, broth kültürü 37 °C’de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, her bir bakteri kültüründen 1’er ml alınarak steril ependorf tüplerine aktarıldı. Daha sonra, sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Bakteri kültürleri 6,000 x *g*’de 2 dk süre ile santrifüj edildi ve tortu dipte kalacak şekilde, üstte kalan sıvı kısım (süpernatant) bir kaba yavaşça boşaltıldı.
2. Dipte kalan tortu (pelet) üzerine kit içeriğinde bulunan R1 tamponundan 100 µl ilave edilerek, bakteri hücreleri resüspanse edildi.
3. Her bir bakteri hücre süspansiyonun üzerine 20 µl lizozim enzimi (50 mg/ml) ilave edilerek, iyi bir şekilde karıştırıldı. Daha önceden sıcaklığı 37 °C’ye ayarlanmış etüvde, 20-30 dk kadar inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrasında, enzimle lize edilen peletler 10,000 x *g*’de 3 dk süre ile santrifüj edildi ve süpernatant kısmı bir kaba yavaşça boşaltıldı.
5. Pelet üzerine kit içeriğinde bulunan R2 tamponundan 180 µl ve 20 µl proteinaz K slüsyonundan (20 mg/ml) ilave edilerek, iyi bir şekilde karıştırıldı. Bu şekilde, daha önceden sıcaklığı 65 °C’ye ayarlanmış olan sıcak su banyosunda 20-30 dk kadar tutuldu.
6. Daha sonra, tüpler sıcak su banyosundan çıkarıldı ve üzerlerine 400 µl kit içeriğinde bulunan BG tamponundan ilave edilerek, iyi bir şekilde karıştırıldı. Tekrar 65 °C’deki sıcak su banyosunda 10 dk kadar tutuldu.
7. Sıcak su banyosundan çıkarılan tüplerin üzerine 200 µl saf alkol ilave edilerek, hemen karıştırıldı.

8. Daha sonra, örnekler 650 µl'lik hacimdeki kolonlara aktarıldı ve 10,000 x g'de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Kolondan geçerek, aşağıya akan sıvı kısım bir kaba yavaşça boşaltıldı.

9. Kolonların üzerine 650 µl yıkama tamponu eklendi ve 10,000 x g'de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında aşağıya akan sıvı kısım bir kaba yavaşça boşaltıldı.

10. Kolonlar 10,000 x g'de 1 dk süre ile santrifüj edilerek kurutuldu.

11. Kurutma sonrasında, her bir kolon steril ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 75 µl kadar kit içeriğinde bulunan elüsyon tamponundan ilave edilerek, 2 dk beklendi. Sonra, 10,000 x g'de 1 dk süre ile santrifüj edildi.

12. Elde edilen DNA'lar, ileri analizler için -20 °C'de stoklandı.

3.2.2.2. İzolatların PCR Yöntemi ile Doğrulanması

Elde edilen izolatlar, Wang ve ark. (1997) tarafından önerilen amplifikasyon koşulları ve primer çiftleri ile hemolizin geni hedef alınarak *B. cereus* yönünden PCR ile doğrulandı. Elde edilen DNA'ların amplifikasyonu için, öncelikle PCR miksi hazırlandı. Bu amaçla, steril ependorf tüpüne 10X ViBuffer A'dan 2.5 µl, 3 µl MgCl₂ (25 mM), 2.5 µl dNTP karışımı, 0.18 µl *Taq* DNA polimeraz enzimi (5U/ µl), 10 pmol/µl konsantrasyonda hazırlanan her bir primerden 0.625 µl, saf sudan 13.57 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. Elde edilen ampliconlar bir sonraki aşamaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2.3. Amplikonların Agaroz Jele Yüklmesi ve Elektroforez İşlemi

Her bir örneğe ait amplikondan 6-8 µl kadar alınarak, %1.5'lik konsantrasyonda hazırlanan agaroz jeldeki kuyucuklara yerleştirildi. Ayrıca, jele pozitif kontrol, negatif kontrol ve DNA ladder (5 µl) yüklendi. Jelin üzeri 0.5xTBE çalışma solüsyonu ile tamamen kaplanarak, 120 voltta 50 dakika süreyle elektroforez (CS-300V, England) işlemi uygulandı. Bu işlemin sonunda, *B. cereus* için spesifik olan amplikonlar, pozitif kontrol ve DNA ladder yardımıyla UV transilluminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sisteminde (UVP, USA) incelendi. Yaklaşık olarak, 185 bp'de bant veren amplikonlar *B. cereus* olarak doğrulandı.

3.2.2.4. İzolatlarda Toksin Genlerinin Varlığının Araştırılması

B. cereus olarak doğrulanan izolatlarda diyareal toksin genleri (*nhe*, *hbl*, *cytK*) ile emetik toksin geninin (*ces*) varlığı multipleks PCR yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla, Ehling-Schulz ve ark. (2006) tarafından önerilen amplifikasyon koşulları ve primer çiftleri kullanıldı (Çizelge 3.1). PCR miksi, her bir izolat için bir ependorf tüpüne, 5 µl 10xPCR buffer, 1 µl 10 mM dNTP karışımı, 1 U Taq DNA Polimeraz, 10 pmol/µl konsantrasyondaki her bir primerden *hbl*, *cytK*, *nhe* ve *ces* genleri için sırasıyla 5 µl, 2 µl, 1.5 µl, 1 µl ve 6 µl 25 mM MgCl₂ 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 amplikonlar, % 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 amplikonlar, DNA ladder yardımıyla UV transilluminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sisteminde (UVP, USA) incelendi.

3.2.3. Psikrotrofik Özelliğinin Belirlenmesi

Doğrulan izolatların psikrotrofik özelliklerini belirlemek için, izolatlar içerisinde 4-5 ml Brain Heart Infusion Broth bulunan tüplerde süspanse edilerek, broth kültürü 37 °C’de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Broth kültürlerinden bir öze dolusu alınarak, Tryptone Soya Agar’a çizme plak yöntemi ile ekim yapılarak, soğutmalı inkübatörde (Velp, Foc 225 I) 7 °C’de aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Plaklardaki üremenin gelişimi 24., 48., 72. saatlerde ve son olarak, 7. gün kontrol edildi.

3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yüzdelik hesaplamalar yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında, Hatay ve Mersin illerindeki farklı süpermarketlerin reyonlarından aseptik koşullarda toplanan bebek ve çocuk beslenmesinde kullanılan gıda örnekleri (toz formundaki bebek maması, kavanoz formundaki mama ile tahıl bazlı ürünler) Ağustos-Eylül-Ekim 2021 tarihlerinde Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarında analize alındı. Toplam 80 adet örnek, *B. cereus* varlığı yönünden klasik kültür tekniği ve PCR yöntemi ile incelendi. Elde edilen izolatlar hemolizin geni hedef alınarak *B. cereus* olarak doğrulandı. Doğrulan izolatlarda psikrotrofik özellik ile hemolitik aktivite belirlenerek, toksin genlerinin (*nhe*, *hbl*, *cytK*, *ces*) varlığı multipleks PCR yöntemiyle araştırıldı.

4.1. Klasik Kültür Tekniği Analiz Sonuçları

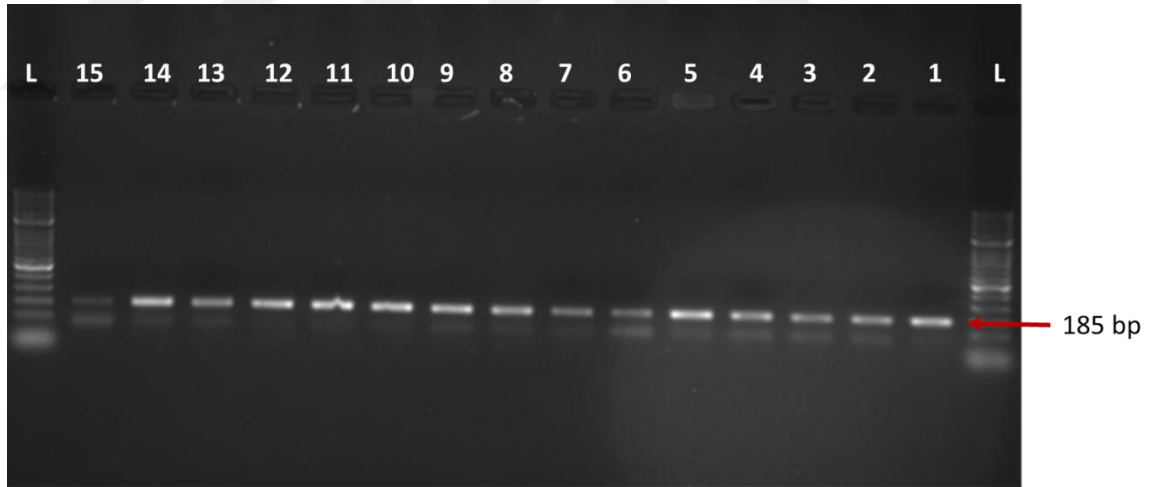
B. cereus'un klasik kültür tekniği ile izolasyonunda selektif katı besiyeri olarak kullanılan Brilliance *Bacillus cereus* Agar'da toplam 80 örneğin 50'sinden (% 62.5) *B. cereus* izole edildi. *B. cereus* yüzdesi analize alınan toplam 55 adet mama örneğinde % 45.4 (25/55) olarak tespit edilirken, ithal toz formundaki mamalarda % 80 (16/20), yerli mamalarda ise % 90 (9/10) düzeyinde bulundu. Ancak, cam kavanozda konserve tipindeki mama örneklerinde ise *B. cereus*'a rastlanılmadı. Toz formundaki bebek mamaları ile tahıl bazlı ürünler sırasıyla % 83.3 (25/30) ve % 100 (25/25) düzeylerinde *B. cereus* ile kontamine olarak bulundu.

Fenotipik olarak, tüm izolatların kanlı agarda hemoliz oluşturabildiği gözlemlendi. Ayrıca, 2 izolatın (% 4, 2/50) psikrotrofik özellikte olduğu ve 7 °C'de üreyebildiği saptandı. Psikrotrofik özellikteki 2 izolat tahıl bazlı ürünlerden elde edildi (Çizelge 4.4).

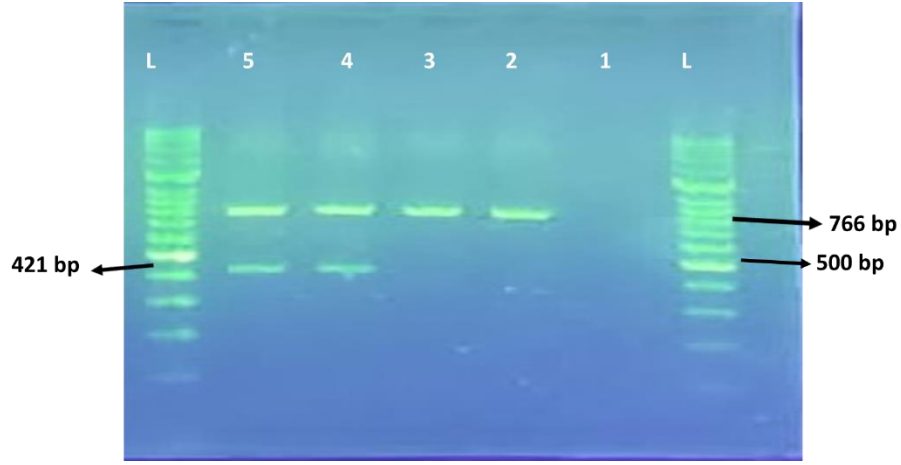
4.2. PCR Analizi Sonuçları

Çalışmada klasik kültür tekniği ile *B. cereus* olarak belirlenen toplam 50 adet izolat hemolizin geni hedef alınarak PCR ile doğrulandı (Şekil 4.1). İzolatların 3 farklı toksijenik profile sahip olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.4). Toplam 13 izolatta (% 26) enterotoksin geni tespit edilirken, izolatların en fazla *nhe* genine sahip olduğu bulundu. Üç izolatta sadece *nhe* genine (% 6, 3/50), 10 izolatta ise hem *nhe* hem de *cytK* genlerine (% 20, 10/50) birlikte rastlanıldı. Emetik sendromdan sorumlu toksini kodlayan *ces* geni ile diyareal sendromdan sorumlu toksini kodlayan *hbl* genini hiçbir izolatın taşımadığı tespit edildi (Şekil 4.2).

İthal toz mamalardan elde edilen 16 izolatın 9'unun (% 56.2), yerli toz mamalardan elde edilen 9 izolatın 3'ünün (% 33.3) ve tahıl bazlı ürünlerden izole edilen 25 izolattan 1'inin (% 4) enterotoksijenik özellikte olduğu bulundu. Enterotoksin geni taşıyan izolatlar sırasıyla en fazla sütü (% 92.3, 12/13), pirinçli (% 30.7, 4/13), meyveli (% 23, 3/13) ve tahıllı (% 23, 3/13) örneklerden saptandı.



Şekil 4.1. Elde edilen *B. cereus* suşlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü [L; DNA ladder (100 bp), 1: Pozitif kontrol, 2-15: *B. cereus* olarak doğrulanan izolatlar (185 bp)].



Şekil 4.2. Elde edilen bazı izolatlarda toksin genlerinin varlığı [L; DNA ladder (100 bp), 1: Negatif kontrol, 2-3: sadece *nhe* pozitif izolatlar (766 bp), 4-5: *cytK+nhe* pozitif izolatlar (421 bp, 766 bp)].

Çizelge 4.1. Kavanoz mamalarında *B. cereus* varlığı.

Numune no	Kavanoz mamaları			
	Ürün cinsi	Petride üreme	Pigmentasyon	<i>B. cereus</i>
1	Meyveli	-	-	-
2	Sütlaç	-	-	-
3	Sebzeli	-	-	-
4	Meyveli	-	-	-
5	Meyveli	-	-	-
6	Sütlaç	-	-	-
7	Sütlaç	-	-	-
8	Meyveli	-	-	-
9	Meyveli	-	-	-
10	Sütlaç	-	-	-
11	Sütlaç	-	-	-
12	Sütlaç	-	-	-
13	Meyveli	-	-	-
14	Meyveli	-	-	-
15	Meyveli	-	-	-
16	Meyveli, yulaflı	-	-	-
17	Meyveli	-	-	-
18	Meyveli, prebiyotikli, yoğurtlu	-	-	-
19	Meyveli	-	-	-
20	Organik, bal kabağı püresi	-	-	-
21	Organik sütlaç	-	-	-
22	Organik, sebzeli, tavuklu pirinçli	-	-	-
23	Organik, sebzeli	-	-	-
24	Meyveli	-	-	-
25	Meyveli	-	-	-

Çizelge 4.2. Toz halindeki mamalarda *B. cereus* varlığı.

Numune no	Toz halindeki mamalar			
	Ürün cinsi	Petride üreme	Pigmentasyon	<i>B. cereus</i>
26	Bebek sütü-ithal	+	+	+
27	Bebek sütü-ithal	+	+	+
28	Vanilyalı kaşık maması-ithal	+	+	+
29	Devam sütü-ithal	+	+	+
30	Bebek sütü-ithal	-	-	-
31	Sütlü, vanilyalı kaşık maması-ithal	-	-	-
32	Devam sütü-ithal	+	+	+
33	Devam sütü-ithal	-	-	-
34	Vanilyalı kaşık maması-ithal	-	-	-
35	Devam sütü-ithal	+	-	+
36	Devam sütü-ithal	+	+	+
37	Bebek sütü-ithal	+	+	+
38	Pirinçli, sütlü-ithal	+	+	+
39	Pirinçli, sütlü-ithal	+	+	+
40	Pirinçli, sütlü-ithal	+	+	+
41	Pirinçli, sütlü-ithal	+	+	+
42	Sütlü, pirinçli, elmalı-ithal	+	+	+
43	Sütlü, buğdaylı, ballı-ithal	+	+	+
44	Bisküvili, sütlü-ithal	+	+	+
45	Elmalı, sütlü-ithal	+	+	+

Çizelge 4.2. Toz halindeki mamalarda *B. cereus* varlığı (devam).

Numune no	Toz halindeki mamalar			
	Ürün cinsi	Petride üreme	Pigmentasyon	<i>B. cereus</i>
46	Sütlü, tahıllı-yerli	+	+	+
47	Sütlü, muzlu, pirinçli-yerli	+	+	+
48	Sütlü, tahıllı-yerli	+	+	+
49	Sütlü, pirinçli, meyveli-yerli	-	+	
50	Sütlü, vitaminli, mineralli-yerli	+	+	+
51	Ballı, ırmikli, pirinç unlu-yerli	+	+	+
52	Sütlü, vitaminli, mineralli-yerli	+	+	+
53	Sütlü, meyveli, tahıllı-yerli	+	+	+
54	Sütlü, meyveli, tahıllı-yerli	+	+	+
55	Sütlü, tahıllı, ırmikli-yerli	+	+	+

Çizelge 4.3. Tahıl bazlı örneklerde *B. cereus* varlığı.

Numune no	Tahıl bazlı örnekler			
	Ürün cinsi	Petride üreme	Pigmentasyon	<i>B. cereus</i>
56	Ambalajlı buğday nişastası	+	+	+
57	Ambalajlı buğday nişastası	+	+	+
58	Ambalajlı mısır nişastası	+	+	+
59	Ambalajlı mısır nişastası	+	+	+
60	Ambalajlı pirinç unu	+	+	+
61	Ambalajlı pirinç unu	+	+	+
62	Ambalajlı pirinç unu	+	+	+
63	Ambalajlı pirinç unu	+	+	+
64	Ambalajlı pirinç unu	+	+	+
65	Ambalajlı buğday nişastası	+	+	+
66	Ambalajlı buğday nişastası	+	+	+
67	Ambalajlı ırmik	+	+	+
68	Ambalajlı ırmik	+	+	+
69	Ambalajlı ırmik	+	+	+
70	Ambalajlı ırmik	+	+	+
71	Ambalajlı ırmik	+	+	+
72	Açık un	+	+	+
73	Açık nişasta	+	+	+
74	Açık un	+	+	+
75	Açık nişasta	+	+	+
76	Açık un	+	+	+
77	Açık un	+	+	+
78	Açık un	+	+	+
79	Açık un	+	+	+
80	Açık un	+	+	+

Çizelge 4.4. Elde edilen *B. cereus* suşlarının virülens özellikleri.

İzolat no	Psikrotrofik özellik	Hemoliz	Toksin genleri				Toksjenik profil
			<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	
26	-	+	+	+	-	-	T ₂
27	-	+	+	+	-	-	T ₂
28	-	+	-	-	-	-	T ₃
29	-	+	-	-	-	-	T ₃
32	-	+	+	+	-	-	T ₂
35	-	+	-	+	-	-	T ₁
36	-	+	-	+	-	-	T ₁
37	-	+	+	+	-	-	T ₂
38	-	+	+	+	-	-	T ₂
39	-	+	-	-	-	-	T ₃
40	-	+	-	-	-	-	T ₃
41	-	+	+	+	-	-	T ₂
42	-	+	+	+	-	-	T ₂
43	-	+	-	-	-	-	T ₃
44	-	+	-	-	-	-	T ₃
45	-	+	-	-	-	-	T ₃
46	-	+	-	-	-	-	T ₃
47	-	+	-	+	-	-	T ₁
48	-	+	-	-	-	-	T ₃
50	-	+	-	-	-	-	T ₃
51	-	+	-	-	-	-	T ₃
52	-	+	-	-	-	-	T ₃
53	-	+	-	-	-	-	T ₃
54	-	+	+	+	-	-	T ₂
55	-	+	+	+	-	-	T ₂
56	-	+	-	-	-	-	T ₃
57	-	+	+	+	-	-	T ₂
58	+	+	-	-	-	-	T ₃

Çizelge 4.4. Elde edilen *B. cereus* suşlarının virülens özellikleri (devam).

İzolat no	Psikrotrofik özellik	Hemoliz	Toksin genleri				Toksikjenik profil
			<i>cytK</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>ces</i>	
59	-	+	-	-	-	-	T ₃
60	-	+	-	-	-	-	T ₃
61	-	+	-	-	-	-	T ₃
62	-	+	-	-	-	-	T ₃
63	-	+	-	-	-	-	T ₃
64	-	+	-	-	-	-	T ₃
65	-	+	-	-	-	-	T ₃
66	-	+	-	-	-	-	T ₃
67	-	+	-	-	-	-	T ₃
68	-	+	-	-	-	-	T ₃
69	-	+	-	-	-	-	T ₃
70	-	+	-	-	-	-	T ₃
71	+	+	-	-	-	-	T ₃
72	-	+	-	-	-	-	T ₃
73	-	+	-	-	-	-	T ₃
74	-	+	-	-	-	-	T ₃
75	-	+	-	-	-	-	T ₃
76	-	+	-	-	-	-	T ₃
77	-	+	-	-	-	-	T ₃
78	-	+	-	-	-	-	T ₃
79	-	+	-	-	-	-	T ₃
80	-	+	-	-	-	-	T ₃

T₁: *cytK*⁻, *nhe*⁺, *hbl*⁻, *ces*⁻; T₂: *cytK*⁺, *nhe*⁺, *hbl*⁻, *ces*⁻; T₃: *cytK*⁻, *nhe*⁻, *hbl*⁻, *ces*⁻.

5. TARTIŞMA

Çalışmada kapsamında incelenen toplam 80 adet örneğin (toz formundaki bebek maması, kavanoz formundaki mamalar ile tahıl bazlı ürünler) 50'sinden (% 62.5) *B. cereus* izole ve identifiye edilmiştir. *B. cereus* varlığı analize alınan toplam 55 adet mama örneğinde % 45.4 (25/55) olarak tespit edilirken, ithal toz formundaki mamalarda % 80 (16/20), yerli toz formundaki mamalarda ise % 90 (9/10) düzeyinde bulundu. Ancak, cam kavanozda konserve tipindeki mama örneklerinde ise *B. cereus*'a rastlanılmadı. Toz formundaki bebek mamaları ile tahıl bazlı ürünler sırasıyla % 83.3 (25/30) ve % 100 (25/25) düzeylerinde *B. cereus* ile kontamine olarak bulundu.

Pozitif örneklerden elde edilen toplam 50 adet izolat hemolizin geni hedef alınarak PCR ile doğrulandı. Toplam 13 izolatta enterotoksin geni tespit edilirken, izolatların en fazla *nhe* genine sahip olduğu bulundu. İzolatlarda *ces* ile *hbl* genlerine rastlanılmadı. Ayrıca, tüm izolatların kanlı agarda hemolitik aktivite gösterdiği ve 2 izolatın (% 4, 2/50) psikrotrofik özellikte olduğu ve 7 °C'de üreyebildiği saptandı.

Çalışmada enteroksin genini taşıyan izolatların sıklıkla sütün bir bileşen olarak kullanıldığı toz mama örneklerinden elde edildiği dikkate alındığında, öncelikle süt ve ürünlerindeki *B. cereus* varlığının belirlenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Bu kapsamda, ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmaları incelediğimizde, Özdemir (2003), Ankara'da satışa sunulan ve farklı firmalara ait toplam 120 pastörize süt örneğinin 56'sında (% 46.6) *B. cereus*'u saptayarak, kontaminasyon düzeyinin ise örneklerin 64'ünde (% 53.3) saptama sınırının ($<1,0 \times 10^1$ kob/ml) altında olduğu bulunmuştur. Yine, Te Giffel ve ark. (1997), Hollanda'da analize aldıkları toplam 334 pastörize süt örneğinin 133'ünden (% 40) *B. cereus*'u izole ederek, örneklerin % 77'sinde *B. cereus* düşük düzeylerde (<5 kob/ml) tespit edilmiştir. Bu çalışmalar, pastörize sütlerin *B. cereus* ile sıklıkla kontamine olabileceğini göstermektedir. *B. cereus* rekabetçi yeteneği zayıf bir bakteri olmasına rağmen, uygulanan ısı işlemi rekabetçi floranın baskılanmasına, dolayısıyla sporların germinasyonu ve ortamda rekabetçi floranın bulunmaması sayesinde *B. cereus* kolaylıkla gelişebilir.

Ahmed ve ark. (1983) tarafından Amerika'da yürütülen bir çalışmada farklı perakende satış noktalarından 5 aylık süre boyunca toplanan 400 adet süt ve ürünleri

B. cereus varlığı yönünden incelenmiştir. Çalışma sonucunda, *B. cereus* toplam 103 örnekte (% 25.75) saptanırken, çiğ ve pastörize sütün sırasıyla, % 9 ve % 35 düzeylerinde etken ile kontamine olduğu bulunmuştur. *B. cereus* varlığının pastörize sütte çiğ süte kıyasla daha yüksek olmasının, pastörizasyonda uygulanan ısı işlemine bağlı olarak sporların germinasyonundan kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Yıbar ve ark. (2017) çiğ süt ve pastörize süt örneklerinde *B. cereus*'u sırasıyla % 3.8, % 26 düzeyinde saptayarak, süt örneklerindeki *B. cereus* sayısını 1×10^1 - 1.1×10^3 kob/ml olarak belirlemişlerdir. Pastörize süt örneklerinde *B. cereus* prevalansının daha yüksek bulunması, üretimde kullanılan sütün yüksek düzeyde *B. cereus* sporu içermesi ile yetersiz pastörizasyon ve pastörizasyon sonrası kontaminasyonlar ile açıklanmıştır.

Etiyopya'daki çiğ süt örneklerinde ise *B. cereus* varlığı % 38.8 düzeyinde tespit edilerek, pozitif bulunan süt örneklerinin % 60'ında *B. cereus* düzeyinin 10^5 kob/ml'nin üzerinde olduğu saptanmıştır (Abraha ve ark. 2017). Can ve ark. (2022) tarafından incelenen çiğ süt örneklerinin % 34.2'sinin *B. cereus* ile kontamine olduğu ve pozitif örneklerden elde edilen izolatların % 66.6'sının psikrotrofik özellikte olduğu bulunmuştur.

Çin' de 1985-1986 yılları arasında yerel marketlerden temin edilen toplam 293 adet süt ve ürünü (pastörize süt, süt tozu, dondurma, fermente süt) *B. cereus* insidensi ile elde edilen izolatların virülens özelliklerini belirlemek üzere analize alınmıştır. Süt tozu ve pastörize süt örnekleri sırasıyla % 29 ve % 2 düzeyinde *B. cereus* ile kontamine olarak belirlenmiştir. Bu çalışmayla benzer şekilde, elde edilen izolatların tümünün hemoliz oluşturabildiği gözlenmiştir (Wong ve ark. 1988). Hollanda'da Te Giffel ve ark. (1997) pastörize süt örneklerinden elde ettikleri 106 izolatın tamamının kanlı agarda hemolitik aktivite gösterdiğini ve % 53'ünün ise 7 °C'de üreyebildiğini bulmuşlardır. Psikrotrofik özellikteki suşların yavaş da olsa 37 °C ve 42 °C'lerde üreyebildiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmadan daha yüksek düzeyde olmak üzere, test edilen 37 izolatın % 76'sının PCR tekniği ile hemolizin BL'yi kodlayan geni taşıdığı ve enterotoksijenik özellikte olduğu bulunmuştur. *B. cereus*'un süt ve ürünlerinde oldukça yüksek düzeylerde bulunabileceği belirtilerek (Ahmed ve ark. 1983, Wong ve ark. 1988), kontamine süt ve ürünlerinin diğer gıdaların üretiminde bir bileşen olarak kullanılması sonucunda, etkenin bu ürünlere de geçebileceği bildirilmiştir. Bu bulguları destekler biçimde, çalışmada enteroksijenik özellikteki izolatlar en fazla süt bazlı örneklerden izole edilmiştir.

Becker ve ark. (1994), arasında Türkiye'nin de yer aldığı 17 farklı ülkede satışa sunulan toplam 261 adet kurutulmuş süt ürünü ile bebek mamalarını incelediklerinde, örneklerin % 54'ünün 0.3-600 EMS/g düzeylerinde *B. cereus* ile kontamine olduğunu bulmuşlardır. Pozitif bulunan örnekler daha çok İsviçre, Avusturya, Belçika ve Almanya'dan toplanan örneklerde rastlanılmıştır. Türkiye'den 15 örnek analize alınarak, *B. cereus* prevalansı % 40 düzeyinde saptanmış olup, bu düzey çalışmadaki toplam mama örneklerindeki *B. cereus* prevalansı ile paralellik göstermektedir. Pozitif bulunan bebek ve devam formüllerinin içeriğinde genel olarak süt ve soya proteininin yer aldığı gözlenmiştir. Çalışma kapsamında >100 EMS/g düzeyinde *B. cereus* içeren örneklerden hazırlanan mamalar 27 °C'de bekletildiğinde, 7-9 saat sonra, bakteri düzeyinin intoksikasyon için kritik limit olarak belirlenen 10⁵ kob/g düzeylerine ulaştığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, hazırlanan mamaların oda sıcaklığında 6 saatten daha uzun bir süre ile bekletilmesinin intoksikasyon açısından bir risk oluşturabileceği belirtilmiştir.

Farklı olarak, Seyrekbasan (2000), Ankara'da çeşitli eczanelerde satılan ve ilk 4-6. aya kadar bebek beslenmesinde kullanılan çeşitli firmalara ait toplam 40 adet toz halindeki ithal bebek mamasının 1'inde (% 2.5) *B. cereus* saptayarak, *B. cereus* sayısını 5x10 kob/g olarak bulmuşlardır. Ergün ve ark. (2002) piyasada satışa sunulan toplam 60 adet mama örneğini (kuru mama, konserve mama) mikrobiyolojik yönden analize aldıklarında, çalışmadan oldukça düşük düzeylerde olmak üzere, *B. cereus*'u ise 2 örnekten (% 3.3) izole ederek, pozitif örneklerin tümünün kuru formdaki mama grubuna ait olduğu belirtilmiştir. Pozitif örneklerdeki *B. cereus* sayısı 2.0 EMS/g ve 2.3 EMS/g olarak bulunmuştur.

Bahçeci ve ark. (2018)'nin yaptıkları çalışmada açık ve kapalı ambalajlı olarak satışa sunulan 20 adet bebek maması (ithal veya yerli), 20 adet bebek maması olarak tüketilen tahıl bazlı gıda (açık veya kapalı formda) ve 5 adet süt tozu olmak üzere toplam 45 adet ürün mikrobiyolojik yönden incelenmiştir. Çalışmadan daha düşük düzeylerde olmak üzere, analize alınan örneklerin 3'ünde (% 7) *B. cereus* tespit edilmiştir. *B. cereus* tespit edilen numunelerin 2'sinin yerli ve paketlenmiş bebek maması, 1'inin ise açıkta satılan irmik olduğu belirlenmiştir. Enterobakteriler ise, yerli ve paketlenmiş bebek maması, paketlenmiş irmik, açıkta satılan irmik ve paketlenmiş nişastadan izole edilmiştir. Çalışmada mikroorganizmaları içeren ürünlerin yerli olması dolayısıyla, Türkiye'de üretilen ve bebek gıdası olarak tüketilen ürünlerin yeterli hijyen koşullarına sahip olmadığı ve bu durumun bebeklerin sağlığı açısından bir risk oluşturabileceği belirtilmiştir.

Vural ve Genç (2022), Diyarbakır'daki marketlerden topladıkları toplam 135 örnekte (bebek formülü, devam formülü, bazı ek gıdalar) *B. cereus*'u % 2.22 olarak çalışmadan daha düşük düzeylerde saptamışlardır. Bebek sütü, devam sütü, tahıl bazlı ek gıdalar, pirinçli-sütlü puding ve sebzeli pürelerde *B. cereus*'u belirleyemezken, meyveli pürelerin % 13.33'ünde $2.15 \log_{10}$ cfu/g ve bebek bisküvi örneklerinin % 6.67'sinde $2.0 \log_{10}$ cfu/g düzeyinde etkeni tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, farklı tarihlerde ülkemizde yürütülen çalışmalarda (Seyrekbasan, 2000; Ergün ve ark., 2002; Bahçeci ve ark., 2018; Vural ve Genç, 2022) bebek mamalarında *B. cereus* prevalansının çalışmadan daha düşük düzeylerde bulunması, analize alınan örneklerin özelliği (mamaların bileşiminde farklı temel ve yardımcı maddelerin kullanılması, ambalaj durumu, üretim tekniği) ile örneklerin farklı yerlerden toplanması, ayrıca etkenin izolasyon ve identifikasyonunda farklı yöntemlerin (biyokimyasal doğrulama kitleri, klasik kültür tekniği, PCR gibi moleküler teknikler) kullanılmasından kaynaklanabilir.

Reyes ve ark. (2007) tarafından Şili'de Okul Beslenme Programı kapsamında yürütülen çalışmada toplam 381 adet kurutulmuş süt ürünlerinde *B. cereus* prevalansını araştırmışlardır. Analiz edilen örneklerin 175'inde (% 45.9) *B. cereus*'a rastlanılmıştır. Çalışma kapsamında, sütlü-pirinçli örneklerin % 35, sütlü-irmikli ürünlerin % 19, sütlü-pirinçli-tahıllı ürünlerin % 11, süt tozunun % 10 düzeyinde *B. cereus* ile kontamine olduğu saptanmıştır. Ayrıca, bazı izolatların enterotoksin oluşturabilme yeteneği ile psikrotrofik özelliklerini incelemişlerdir. Benzer şekilde, test edilen 94 izolatın 28'i (% 29.8) enterotoksijenik özellik gösterirken, bu çalışmadan farklı olarak, izolatların hiçbirisinin 7 °C'nin altında üreyemediği gözlenmiştir.

Shadlia-Matug ve ark. (2008), Libya'da satışa sunulan toplam 84 adet yerli ve ithal bebek mamalarını mikrobiyolojik yönden analize almışlardır. Toz formundaki mama örneklerinin bileşiminde pirinç, buğday, yulaf, arpa unu, yağsız süt tozu, tam yağlı süt ile bunların çeşitli kombinasyonları yer almaktadır. Mama örneklerinin % 64.3'ünde *Bacillus* spp.'yi saptayarak, kontaminasyon düzeyi ise $2 \log_{10}$ kob/g'ın üzerinde bulunmuştur.

Çalışmadaki toplam mama örneklerindeki *B. cereus* düzeyine benzer şekilde, Rahimi ve ark. (2013), İran'da dört farklı içerikteki 200 adet bebek mamasının 84'ünden (% 42) *B. cereus*'u izole etmişlerdir. Örnek bazında değerlendirildiğinde, *B. cereus* pirinçli-sütlü mamalarda % 62, buğdaylı-sütlü örneklerde % 50, ballı-sütlü-buğdaylı içerikteki örneklerde % 36,

muzlu-sütlü-buğdaylı olanlarda ise % 20 düzeyinde belirlenmiştir. Mama örneklerinin tümü pastörize ürünler olmasına rağmen, her bir mama örneğinin gramında 3×10^1 - 9.3×10^1 arasında *B. cereus* sporuna rastlanılmıştır. Elde edilen izolatların enterotoksijenik özellikleri incelendiğinde, çalışmadan farklı olarak, izolatların en fazla (% 61.9) *entFM* (enterotoksin FM) genini taşıdığı ve ayrıca, düşük düzeyde de olsa izolatların *hblA* genine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çin’de kırsal ve kentsel alandaki marketlerden toplanan 6656 adet toz halindeki bebek formülü ile devam formülü örneklerinin % 92.4’ünde *B. cereus* <10 kob/g olarak saptanırken, mama örneklerinin % 7.5’unda ≥ 10 kob/ g ve % 1.1’inde ise > 100 kob/g düzeylerinde bulunmuştur (Pei ve ark. 2018).

Kolombiya’da analize alınan toplam 305 adet toz formundaki gıda örneklerinde, *B. cereus* sırasıyla % 11 bebek sütünde, % 13 süt tozunda, % 10 buğday ununda, % 12 mısır nişastasında bulunmuştur. *B. cereus*’un kurutulmuş toz formundaki örneklerde düşük düzeylerde bulunması, bu örneklerdeki rutubet miktarının oldukça düşük düzeylerde olması nedeniyle, etkenin sadece spor formlarının canlılığını sürdürebileceği ve dolayısıyla, mikrobiyel üremenin engellenebileceği belirtilmiştir. Elde edilen izolatlarda toksin genlerinin (*hblA*, *hblB*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK2*, *cesB*, *entFM*) varlığı incelendiğinde, izolatların tümünün (% 100) *nheABC* operonuna sahip olduğu bulunurken, *cytK2* ve *entFM* genleri izolatların % 62’sinde tespit edilmiştir, ancak çalışmaya benzer şekilde *ces* genine izolatlarda rastlanılmamıştır. İzolatlarda 15 farklı toksin profili gözlenirken, izolatların *ces* geni dışında diğer tüm toksin genlerini içeren toksijenik profile yaygın olarak sahip oldukları bulunmuştur (Sánchez-Chica ve ark. 2021).

Çalışmadan daha düşük düzeylerde olmak üzere, Kore’de analize alınan toplam 293 tahıl bazlı örneğin (pirinç, arpa) % 25’inde *B. cereus* saptanmıştır. Benzer şekilde izolatlarda en fazla *nhe* genine (% 99) rastlanılmıştır. Daha sonra izolatlarda sırasıyla *hblDC* (% 84) ve *cytK* (% 55) genlerinin varlığı tespit edilmiştir (Park ve ark. 2009).

Tunus’ta 2014-2015 yılları arasında süpermarket, restoran, otel ve özel işletmelerden rastgele toplanan ve aralarında tahıl bazlı ürünlerin de yer aldığı toplam 687 gıda örneği *B. cereus* varlığı yönünden analize alınmıştır. Tahıl bazlı ürünlerde (buğday ve arpa unu, irmik, makarna, kuskus) *B. cereus* kontaminasyonu % 67.6 olarak tespit edilerek, çalışmada analize alınan diğer örneklerle (baharat, tavuk eti, süt ürünleri, sebze, konserve gıda, deniz

ürünleri) göre en yüksek düzeyde saptanmıştır. Tahıl bazlı ürünlerden PCR tekniği ile elde ettikleri 23 izolatın enterotoksijenik özelliklerini incelediklerinde, izolatların en fazla *nhe* genine, daha sonra sırasıyla *cytK*, *hbl* genlerine sahip olduğu bulunurken, izolatlarda *ces* genine rastlanılmamıştır (Gdoura-Ben Amor ve ark. 2018, Gdoura-Ben Amor ve ark. 2019). Benzer şekilde, diğer çalışmalarda da en fazla *nhe* geninin tespit edilmesi, diyarel hastalıklardan en çok sorumlu tutulan enterotoksinin *Nhe* olmasını (Stenfors Arnesen ve ark. 2008) destekler biçimdedir. Ancak, bazı suşların birden fazla enterotoksin üretebildiği ve toksinlerin birlikteyken sinerjik etki gösterebildiği, bu durumda her bir toksinin in vivo olarak aktivitesini belirlemenin güç olduğu bildirilmiştir. *EntFM* geni tarafından kodlanan enterotoksin FM (sitotoksin), hemolizin, kollajenaz ve fosfolipazlar da *B. cereus*'a ait virülens faktörleri olup, ancak etki mekanizmaları henüz tam olarak belirlenememiştir (Logan 2012).

6. SONUÇ

Çalışma kapsamında analize alınan toz formundaki mamalar ile tahıl bazlı ürünlerde *B. cereus* varlığı sırasıyla % 83.3, % 100 olarak saptanması, bu ürünlerin üretiminde alınan hijyenik önlemlerin yeterli olmadığını, dolayısıyla *B. cereus* ile kontaminasyon düzeyinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. *B. cereus* ile kontaminasyon düzeyi yerli toz formundaki mamalarda ithal olanlara göre, % 10 düzeyinde daha yüksek olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, ithal toz mamalardan elde edilen izolatların yerli toz mamalardan elde edilen izolatlara göre, enterotoksin genlerini daha fazla düzeyde taşıdığı tespit edilmiştir. Bu kapsamda, bazı izolatların diyarel tip toksinlerin sentezinden sorumlu genlere sahip olması, bebek ve çocuklarda gıda intoksikasyonu açısından bir tehlike potansiyeli oluşturabilir. Aksine, konserve tekniği ile üretilen cam kavanoz mamalarında *B. cereus*'un tespit edilememesi, üretiminde uygulanan sterilizasyon işleminin yeterli düzeylerde yapıldığını ve hijyenik açıdan güvenli olduğunu göstermektedir.

Bununla birlikte, hem açık hem de ambalajlı olarak satılan tahıl bazlı ürünlerde *B. cereus*'un bulunması, bu ürünlerin paketlenme aşamasında da gerekli hijyenik önlemlerin alınmadığını ortaya koymaktadır. Çalışmada ambalajlı mısır nişastası ve irmikten elde edilen iki izolatın psikrotrofik özellikte olduğu dikkate alındığında, bunlardan hazırlanan gıdaların buzdolabı sıcaklığında muhafazası sırasında, bu izolatlar yavaş da olsa üremeye devam ederek infektif doza ulaşabilirler.

Sonuç olarak, incelenen toz mama ve tahıl bazlı ürünlerde enterotoksijenik ve psikrotrof özellikteki *B. cereus* suşlarının varlığı, immun sistem ile bağırsak mikrobiotasının tam olarak gelişmediği bebek ve küçük çocukların beslenmesinde tehlikeli olabileceği ifade edilebilir. Bu yaş grubunun beslenmelerinde kullanılan gıdaların mikrobiyolojik yönden güvenilirliğinin belirlenmesi gerektiğinden, bu alanda daha fazla ve kapsamlı çalışmanın yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **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. *Food Contamination*, **2017**, 4, 15.
2. **Adame-Gómez R, Muñoz-Barrios S, Castro-Alarcón N, Leyva-Vázquez MA, Toribio-Jiménez J ve ark.** Prevalence of the strains of *Bacillus cereus* group in artisanal Mexican cheese. *Foodborne Pathogens and Disease*, **2020**, 17 (1): 8-14.
3. **Agata N, Ohta M, Yokoyama K.** Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*, **2002**, 73(1):23-27.
4. **Ahmed AA-H, Moustafa MK, Marth EH.** Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. *Journal of Food Protection*, **1983**, 46 (2): 126-128.
5. **Anderson SA, Chinn HI, Fisher KD.** History and current status of infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1982**, 35(2): 381-397.
6. **Anonim (2011).** Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Resmi Gazete, Sayı: 28157 (3. Mükerrer).
7. **Anonim (2019a).** Türk Gıda Kodeksi. Bebek ve Küçük Çocuklara Yönelik Gıdalar ile Vücut Ağırlığı Kontrolü için diyetin yerini alan gıdalar yönetmeliği. Resmi Gazete, Sayı: 30819.
8. **Anonim (2019b).** Türk Gıda Kodeksi Bebek Formülleri ve Devam Formülleri Tebliği. Tebliğ No: 2019/14. Resmi Gazete, Sayı: 30819.
9. **Arnold JC, Engel RW, Aguilon DB, Caedo MM.** Utilization of family characteristics in nutritional classification of preschool children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1981**, 34(11): 2546-2550.
10. **Bahçeci T, Çakmak Sancar B, Özpınar H.** Bebek beslenmesinde kullanılan gıdaların mikrobiyolojik kalitelerinin araştırılması. *Aydın Gastronomi*, **2018**, 2(1):15-20.
11. **Barness LA.** History of infant feeding practices. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1987**, 46: 168-170.
12. **Barness LA.** Infant Feeding: Formula, Solids. *Symposium on Nutrition, Pediatric Clinics of North America*, **1985**, 35(2): 355-362.
13. **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):1-15.
14. **Berthold-Pluta A, Pluta A, Garbowska M, Stefańska I.** Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. *Foods*, **2019**, 19;8(7):269.
15. **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.
16. **Dalkılıç Kaya G.** Süt ürünleri ve bebek mamalarında *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) varlığının araştırılması ve gelişmesine sıcaklık ve şeker çeşitlerinin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2011**.
17. **Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindbäck T, Andersson M ve ark.** Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology (Reading)*, **2005**, 151(Pt 1):183-197.
18. **Ehling-Schulz M, Guinebretiere MH, Monthan A, Berge O, Fricker M ve ark.** Toxin gene profiling of enterotoxigenic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, **2006**, 260(2):232-240.
19. **Ergün Ö, Aksu H, Arun ÖÖ, Çolak H.** Ülkemizde satılan bebek ve çocuk mamalarında gıda zehirlenmesine neden olan önemli bazı mikroorganizmaların varlığı üzerine araştırmalar. *Gıda*, **2002**, 27(4):253-257.
20. **FAO/WHO.** *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: Meeting report. *Microbiological Risk Assessment Series No.6*, **2004**. Erişim tarihi: 15.11.2021 <https://www.who.int/publications/i/item/9789241562775>.
21. **Frankland GC, Frankland PF.** Studies on some new microorganisms obtained from air. *Royal Soc. London Phil. Trans., Ser. B, Biol. Sci.*, **1887**, 178:257-287.
22. **Genç E, Vural A.** Bebek ve küçük çocuk gıdalarında bakteriyel sağlık riskleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, **2021**, 51(1): 1-10.

23. **Gdoura-Ben Amor M, Siala M, Zayani M, Grosset N, Smaoui S ve ark.** Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia. *Frontiers in Microbiology*, **2018**, 9: 447.
24. **Gdoura-Ben Amor M, Jan S, Baron F, Grosset N, Culot A ve ark.** Toxigenic potential and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* group bacteria isolated from Tunisian foodstuffs. *BMC microbiology*, **2019**, 19(1): 196.
25. **Gökçay G, Eren T, Devecioğlu E.** Bebek mamalarındaki katkı maddeleri. *Çocuk Dergisi*, **2012**, 12(2): 60-65.
26. **Granum PE, Lund T.** *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, **1997**, 157:223-228.
27. **Hauge S.** Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, **1955**, 18:591-595.
28. **Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M.** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, **2000**, 2(2):189-198.
29. **Liu XY, Hu Q, Xu F, Ding SY, Zhu K.** Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China. *Toxins*, **2020**, 12(7), 454.
30. **Logan NA.** *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, **2012**, 112(3):417-429.
31. **Shadlia-Matug MS, Aidoo KE, Candlish AA, Elgerbi AM.** Evaluation of some antibiotics against pathogenic bacteria isolated from infant foods in North Africa. *The Open Food Science Journal*, **2008**, 2:95-101.
32. **Özarslan F, Duman P, Çetin Çoban S, Barlas G, Temel F.** Aksaray, Nevşehir ve Niğde illerindeki ilçe okullarında stafilokokal enterotoksin ve *Bacillus cereus* ilişkili gıda kaynaklı salgın. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **2018**, 75(4):399-408.
33. **Özdemir H.** Pastörize sütlerde *Bacillus cereus*'un varlığı. *Gıda*, **2003**, 28 (6):611-614.
34. **Park YB, Kim JB, Shin SW, Kim JC, Cho SH ve ark.** Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *Journal of Food Protection*, **2009**, 72(3):612-7.
35. **Pei X, Yang S, Zhan L, Zhu J, Song X ve ark.** Prevalence of *Bacillus cereus* in powdered infant and powdered follow-up formula in China. *Food Control*, **2018**, 93:101-105.
36. **Rahimi E, Abdos F, Momtaz H, Baghbadorani ZT, Jalali M.** *Bacillus cereus* in infant foods: Prevalence Study and Distribution of Enterotoxigenic Virulence Factors in Isfahan Province, Iran. *The Scientific World Journal*, **2013**, 292571.
37. **Reyes JE, Bastias JM, Gutierrez MR, Rodriguez M.** Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, **2007**, 24 (1):1-6.
38. **Sağlam D, Şeker E.** Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler. *Kocatepe Veterinary Journal*, **2016**, 9(2): 105-113.
39. **Sánchez-Chica J, Correa MM, Aceves-Diez AE, Castañeda-Sandoval LM.** Genetic and toxigenic diversity of *Bacillus cereus* group isolated from powdered foods. *Journal of Food Science and Technology*, **2021**, 58(5):1892-1899.
40. **Schneider KR, Parish ME, Goodrich RM, Cookingham T.** Preventing foodborne illness: *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. *Institute of Food and Agricultural Sciences*, **2004**, FSHN04-05.
41. **Schoch CL, Ciuffo S, Domrachev M, Hutton CL, Kannan S ve ark.** NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, **2020**, 1-21.
42. **Selçuk H.** Malnütrisyon ve önemi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, **2012**, 16(2): 158-162
43. **Seyrekbasan BK.** Türkiye’de kullanılan ithal bebek mamalarının mikrobiyolojik kalite kontrolleri üzerinde araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2000**.
44. **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.
45. **Stoeckel M, Westermann A, Atamer Z, Hinrichs J.** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Science and Technology*, **2013**, 93 (2):163-175.
46. **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.
47. **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.

48. **Tewari A, Abdullah S.** Bacillus cereus food poisoning: international and Indian perspective. *Journal of Food Science and Tecnology*, **2015**, 52(5): 2500-2511.
49. **Vural A, Genç E.** Hygienic Quality Features in Baby Formulas, Follow-On Formulas, and Some Supplementary Foods. *Acta Vet Eurasia*, **2022**; 48(2): 109-116.
50. **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.
51. **WHO.** Five keys to safer food manual. **2006**. Erişim: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241594639>. Erişim tarihi: 17.02.2022
52. **WHO.** Fact sheets. Malnutrition. **2021a**. Erişim: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>. Erişim tarihi: 17.02.2022
53. **WHO.** Fact sheets. Infant and young children feeding. **2021b**. Erişim: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding>. Erişim tarihi: 17.02.2022
54. **WHO.** Fact sheets. Food safety. **2022**. Erişim: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Erişim tarihi: 17.02.2022
55. **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.
56. **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.
57. **Yurdakul Ö, Keyvan E, Kahraman HA, Şen E, Baytaroglu AR.** *Bacillus cereus*'un risk profili ve halk sağığı yönünden etkileri. 1. Uluslararası Sağığı Bilimleri ve Yaşam Kongresi. Burdur, 2-5 Mayıs 2018, s.173-182.
58. **Zhang Z, Fend L, Xu H, Liu C, Shah NP ve ark.** Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis and toxigenity from read-to-eat foods and infant formula milk powder by multible PCR. *Journal of Dairy Science*, **2016**, 99: 1047-1055.

ÖZGEÇMİŞ

2011 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı ve 2016 yılında aynı fakülteden mezun oldu. 16.09.2019 tarihinde Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veterinerlik Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Şu anda Mersin ilinde Veteriner Sınır Kontrol Noktası Müdürlüğü'nde veteriner hekim olarak görev yapmaktadır.

