

**ÇEŞİTLİ ET ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *BACILLUS*
TÜRLERİNİN TANIMLANMASI, PROTEOLİTİK VE LİPOLİTİK
ENZİM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAKAN ÖZDOĞAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİM 2007
ANKARA**

Hakan ÖZDOĞAN tarafından hazırlanan ÇEŞİTLİ ET ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN TANIMLANMASI, PROTEOLİTİK VE LİPOLİTİK ENZİM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Nihal YÜCEL
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.
Prof. Dr. Belma ASLIM
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.
Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR
Biyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Ü.
Doç. Dr. Nihal YÜCEL
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.
Doç. Dr. Sumru ÇITAK
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Tarih: 16 / 10 / 2007

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hakan ÖZDOĞAN

**ÇEŞİTLİ ET ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN
TANIMLANMASI, PROTEOLİTİK VE LİPOLİTİK ENZİM
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Hakan ÖZDOĞAN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ekim 2007

ÖZET

Bu çalışmada, Ankara ilinde çeşitli kasap ve marketlerde tüketime sunulan 15'er adet kuşbaşı, kıyma ve tavuk olmak üzere toplam 45 adet et örneğinde mezofilik *Bacillus* cinsi bakterilerin varlığı ile koliform grup mikroorganizma / *E. coli* sayısı araştırılmıştır. Tanımlanan bu *Bacillus* türlerinin proteolitik ve lipolitik enzim aktiviteleri çalışılmıştır. Bu çalışmada aynı zamanda *Satujera wiedemanniana* (Lalem.) Velen. bitkisinden elde edilen uçucu yağın *Bacillus* türleri üzerine antimikrobiyal etkisi de araştırılmıştır. İncelenen örneklerden kuşbaşı ve kıyma et örneklerinin hepsinde (%100), tavuk örneklerinin 12'sinde (%80) *Bacillus* cinsi bakterilerin varlığı tespit edilmiştir. Bu örneklerden toplam 279 *Bacillus* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların 121'i (%36,2) *B. circulans*, 52'si (%18,6) *B. firmus*, 40'ı (%14,3) *B. lentus*, 39'u (%13,9) *B. megaterium*, 34'ü (%12,1) *B. licheniformis*, 9'u (%3,2) *B. mycoides*, 3'ü (%1) *B. sphaericus*, 1'i de (%0,3) *B. cereus* olarak tanımlanmıştır. Kuşbaşı ve kıyma et örneklerinden *B. circulans* sırasıyla 42 (%63,6), 52 (%29,5), tavuk etinden 9 (%24,3) *B. megaterium* en fazla izole edilen *Bacillus* türleridir.

İncelenen örneklerde koliform grup mikroorganizma / *E. coli* sayısı EMS yöntemine göre <0,30 adet/gr ile >110,0 adet/gr arasında değişen değerlerde

hesaplanmıştır. 45 örneğin 24'ünde koliform mikroorganizma sayısı >110,0 adet/ gr, *E. coli* sayısı 5 örnekte >110,0 adet/ gr değerlerinde bulunmuştur.

Tanımlanan *Bacillus* izolatlarının proteolitik ve lipolitik enzim aktivite sonuçları değerlendirildiğinde 279 *Bacillus* izolatının 168 (%60,2)'inin proteolitik enzim aktivitesi, 132 (%47,3)'sinin lipolitik enzim aktivitesi pozitif olarak bulunmuştur.

Satujera wiedemanniana (Lalem.) Velen. bitkisinden elde edilen uçucu yağın *Bacillus* türleri üzerine antimikrobiyal etkisi agar kuyu difüzyon metoduna göre araştırılmıştır. Uçucu yağlarda antimikrobiyal aktivite en fazla *B. megaterium*'da ($17,0 \pm 3,0$ mm), en zayıf *B. cereus*'da ($3,0 \pm 0,5$ mm) bulunmuştur.

Bilim Kodu : 203.1.010
Anahtar Kelimeler : *Bacillus*, proteolitik ve lipolitik aktivite
Sayfa Adedi : 139
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Nihal YÜCEL

**IDENTIFICATION OF *BACILLUS* SPECIES ISOLATED FROM
DIFFERENT RETAIL MEAT, INVESTIGATION OF THEIR
PROTEOLYTIC AND LIPOLYTIC ENZYMES ACTIVITIES**
(M. Sc. Thesis)

Hakan Özdoğan

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
October 2007**

ABSTRACT

In this study, the prevalence of *Bacillus* species and the number of coliform group microorganism / *E. coli* was investigated a total of 45 samples of meat products consisting of 15 meat balls, 15 minced meat, 15 chicken meat collected from different butcheries and retail markets in Ankara. The proteolytic and the lipolytic activities of identified this *Bacillus* species was studied. At the same time in this study the antimicrobial activity of essential oil that obtained from *Satujera wiedemanniana* (Lalem.) Velen. against *Bacillus* species was investigated. *Bacillus* species were detected on all of analyzed 15 meat balls (%100) and 15 minced meat samples (%100) and 12 of 15 chicken meat (%80). From this samples 279 isolates were obtained. This isolates were identified as 121 (%36,2) *B. circulans*, 52 (%18,6) *B. firmus*, 40 (%14,3) *B. lentus*, 39 (%13,9) *B. megaterium*, 34 (%12,1) *B. licheniformis*, 9 (%3,2) *B. mycoides*, 3 (%1) *B. sphaericus* and 1 (%0,3) *B. cereus*. *B. circulans* were the most isolated *Bacillus* spp. from meat balls and minced meat samples 42 (%63,6), 52 (%29,5) respectively, and 9 (%24,3) *B. megaterium* were the most isolated *Bacillus* species from chicken meat.

In the examined samples, the number of coliform group microorganism / *E. coli* was calculated by using Most Probable Number technique. It was found

between $<0,30$ unit/gr and $>110,0$ unit/gr. The number of coliform group microorganism samples were counted in 24 samples $>110,0$ unit/gr. The number of *E. coli* were found in 5 samples $>110,0$ unit/gr.

The proteolytic and the lipolytic enzyme activities of identified *Bacillus* isolates were evaluated. The proteolytic enzyme activity of 168 of 279 (%60,2) *Bacillus* isolates and the lipolytic enzyme activity of 132 of 279 (%47,3) *Bacillus* isolates found as positive.

The antimicrobial activity of essential oil obtained from *Satujera wiedemanniana* (Lalem.) Velen against *Bacillus* species was investigated by the agar-well diffusion method. Essential oil showed the strongest antimicrobial activity against *B. megaterium* ($17,0 \pm 3,0$ mm), while showed the weakest antimicrobial activity against *B. cereus* ($3,0 \pm 0,5$ mm).

Science Code : 203.1.010
Key Words : *Bacillus*, proteolytic and lipolytic activity
Page Number : 139
Adviser : Assoc. Prof. Dr. Nihal YÜCEL

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Doç. Dr. Nihal YÜCEL'e, yine kıymetli tecrübelerinden faydalandığım hocam Prof. Dr. Belma ASLIM'a ve laboratuvarında görevli tüm çalışma arkadaşlarıma, manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	3
2.2. <i>E. coli</i> ve Koliform Mikroorganizmaların Genel Özellikleri.....	40
2.3. Kekik (<i>Satujera wiedemanniana</i>) Bitkisi Uçucu Yağının Antimikrobiyal Aktivitesi.....	51
3. MATERYAL VE METOD.....	54
3.1. Örneklerin Toplanması.....	54
3.2. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Tanımlanması ve Tanımlanmada Kullanılan Testler.....	54
3.3. <i>Bacillus</i> Türlerinin İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri.....	58
3.4. <i>Bacillus</i> Suşlarının Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri ve Uygulanan Testler.....	59
3.5. <i>Bacillus</i> Türlerinin Proteaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	69
3.6. <i>Bacillus</i> Türlerinin SMA'da Proteaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Besiyerleri.....	70

Sayfa

3.7. <i>Bacillus</i> Türlerinin Lipaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	71
3.8. <i>Bacillus</i> Türlerinin TA’da Lipaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Besiyeri.....	71
3.9. Koliform Grup Mikroorganizma ve <i>E. coli</i> Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Besiyeri.....	73
3.10. Et Örneklerinden Koliform Grup Mikroorganizma ve <i>E.coli</i> Varlığının Belirlenmesi.....	73
3.11. Kekik (<i>Satujera wiedemanniana</i>) Bitkisi Uçucu Yağının Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	76
4. BULGULAR.....	77
4.1. Mezofilik <i>Bacillus</i> Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	77
4.2. Et Örneklerinden Koliform Grup Mikroorganizma ve <i>E. coli</i> Sayımı.....	82
4.3. <i>Bacillus</i> Türlerinin Proteaz ve Lipaz Enzim Aktiviteleri.....	84
4.4. Kekik (<i>Satujera wiedemanniana</i>) Bitkisi Uçucu Yağının <i>Bacillus</i> Türleri Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesi.....	109
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	113
KAYNAKLAR.....	127
ÖZGEÇMİŞ.....	139

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Bacillus anthracis</i> 'in virulans faktörleri ve immünolojik etkileri.....	13
Çizelge 2.2. Bazı <i>Bacillus</i> türleri ve oluşturdıkları infeksiyonlar.....	28
Çizelge 3.1. Çeşitli et örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler.....	56
Çizelge 3.2. Çeşitli et örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin tanımlanmasında kullanılan karbonhidrat fermentasyon testleri.....	57
Çizelge 3.3. EMS tablosu.....	75
Çizelge 4.1. İzole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin et örnekleri ve örnek sayısına göre dağılımları.....	77
Çizelge 4.2. İncelenen et örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türleri ve izolat sayısı.....	79
Çizelge 4.3. İncelenen tavuk örneklerindeki koliform grubu mikroorganizma ve <i>E. coli</i> sayım sonuçları (adet/gr).....	82
Çizelge 4.4. İncelenen kuşbaşı ve kıyma örneklerindeki koliform grubu mikroorganizma ve <i>E. coli</i> sayım sonuçları (adet/gr).....	83
Çizelge 4.5. Çeşitli et örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> izolatlarının Skim Milk Agar'daki proteaz enzim aktivite sonuçları.....	85
Çizelge 4.6. <i>Bacillus</i> izolatlarının incelenen et çeşitlerine göre proteaz enzim aktivite sonuçları.....	86
Çizelge 4.7. <i>B. licheniformis</i> 'in proteaz enzim aktivite değerleri.....	88
Çizelge 4.8. <i>B. megaterium</i> 'un proteaz enzim aktivite değerleri.....	89
Çizelge 4.9. <i>B. circulans</i> 'in proteaz enzim aktivite değerleri.....	90
Çizelge 4.10. <i>B. lentus</i> 'un proteaz enzim aktivite değerleri.....	91
Çizelge 4.11. <i>B. firmus</i> proteaz enzim aktivite değerleri.....	92

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.12. <i>B. mycoides</i> 'in proteaz enzim aktivite değerleri.....	93
Çizelge 4.13. <i>B. sphaericus</i> 'un proteaz enzim aktivite değerleri.....	94
Çizelge 4.14. <i>B. cereus</i> 'un proteaz enzim aktivite değeri.....	95
Çizelge 4.15. Çeşitli et örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> izolatlarının Tributyrin Agar'daki lipaz enzim aktivite sonuçları.....	96
Çizelge 4.16. <i>Bacillus</i> izolatlarının incelenen et çeşitlerine göre lipolitik enzim aktivite sonuçları.....	97
Çizelge 4.17. <i>B. licheniformis</i> 'in lipolitik enzim aktivite değerleri.....	100
Çizelge 4.18. <i>B. megaterium</i> 'un lipolitik enzim aktivite değerleri.....	101
Çizelge 4.19. <i>B. circulans</i> 'ın lipolitik enzim aktivite değerleri.....	102
Çizelge 4.20. <i>B. lentus</i> 'un lipolitik enzim aktivite değerleri.....	103
Çizelge 4.21. <i>B. firmus</i> 'un lipolitik enzim aktivite değerleri.....	104
Çizelge 4.22. <i>B. mycoides</i> 'in lipolitik enzim aktivite değerleri.....	105
Çizelge 4.23. <i>B. sphaericus</i> 'un lipolitik enzim aktivite değerleri.....	106
Çizelge 4.24. <i>B. cereus</i> 'un lipolitik enzim aktivite değeri.....	107
Çizelge 4.25. Kekik (<i>Satureja wiedemanniana</i>) uçucu yağının <i>Bacillus</i> türleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi ve meydana gelen inhibisyon zon çapları.....	109

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. <i>Bacillus</i> 'ların izole edildiği et örneklerine göre dağılımı.....	78
Şekil 4.2. İncelenen 45 et örneğinden izole edilen toplam 279 <i>Bacillus</i> izolatının türlere göre dağılımı.....	80
Şekil 4.3. Çeşitli et örneklerinden izole edilen <i>Bacillus</i> türlerinin kaynaklara göre dağılımı.....	81
Şekil 4.4. Proteaz enzim aktivitesi pozitif ve negatif olan <i>Bacillus</i> izolatlarının dağılımı.....	85
Şekil 4.5. İncelenen et çeşitlerine göre pozitif ve negatif proteaz enzim aktivitelerinin yüzdesel dağılımı.....	86
Şekil 4.6. Proteolitik aktivitesi kuvvetli pozitif, orta pozitif , zayıf pozitif ve negatif olan <i>Bacillus</i> izolat sayısının türlere göre dağılımı.....	87
Şekil 4.7. <i>B. licheniformis</i> izolatlarının proteolitik aktivitesi.....	88
Şekil 4.8. <i>B. megaterium</i> izolatlarının proteolitik aktivitesi.....	89
Şekil 4.9. <i>B. circulans</i> izolatlarının proteolitik aktivitesi.....	90
Şekil 4.10. <i>B. lentus</i> izolatlarının proteolitik aktivitesi.....	91
Şekil 4.11. <i>B. firmus</i> izolatlarının proteolitik aktivitesi.....	92
Şekil 4.12. <i>B. mycoides</i> izolatlarının proteolitik aktivitesi.....	93
Şekil 4.13. <i>B. sphaericus</i> izolatlarının proteolitik aktivitesi.....	94
Şekil 4.14. Lipolitik enzim aktivitesi pozitif olan <i>Bacillus</i> izolat sayısı ile negatif olan <i>Bacillus</i> izolat sayısının sayısal dağılımı.....	97
Şekil 4.15. İncelenen et çeşitlerine göre pozitif ve negatif lipaz enzim aktivitelerinin yüzdesel dağılımı.....	98
Şekil 4.16. Lipolitik aktivitesi kuvvetli pozitif, orta pozitif , zayıf pozitif ve negatif olan <i>Bacillus</i> izolat sayısının türlere göre dağılımı.....	99

Şekil	Sayfa
Şekil 4.17. <i>B. licheniformis</i> izolatlarının lipolitik aktivitesi.....	100
Şekil 4.18. <i>B. megaterium</i> izolatlarının lipolitik aktivitesi.....	101
Şekil 4.19. <i>B. circulans</i> izolatlarının lipolitik aktivitesi.....	102
Şekil 4.20. <i>B. lentus</i> izolatlarının lipolitik aktivitesi.....	103
Şekil 4.21. <i>B. firmus</i> izolatlarının lipolitik aktivitesi.....	104
Şekil 4.22. <i>B. mycoides</i> izolatlarının lipolitik aktivitesi.....	105
Şekil 4.23. <i>B. sphaericus</i> izolatlarının lipolitik aktivitesi.....	106

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Bacillus</i> yüzeyi	4
Resim 2.2. Negatif boyamada <i>Bacillus anthracis</i> kapsülü.....	5
Resim 2.3. Çeşitli <i>Bacillus</i> türlerinde flagellar boyama.....	6
Resim 2.4. Nutrient agarda fotoğraflanan hareketli <i>Bacillus</i> hücreleri.....	7
Resim 2.5. <i>Bacillus</i> endosporu.....	8
Resim 2.6. <i>Bacillus cereus</i> spor boyama.....	10
Resim 2.7. Kanlı Agarda <i>Bacillus cereus</i> kolonileri.....	10
Resim 2.8. <i>Bacillus anthracis</i> gram boyama.....	11
Resim 2.9. Kanlı agarda <i>Bacillus anthracis</i> kolonileri.....	11
Resim 2.10. <i>B. coagulans</i> gram boyama.....	15
Resim 2. 11. <i>E. coli</i> 'nin morfolojisi.....	41
Resim 2. 12. <i>E. coli</i> 'nin mikroskoptaki görünümü.....	41
Resim 2.13. <i>Satureja cuneifolia</i> bitkisi.....	52
Resim 2.14. <i>Satureja hortensis</i> bitkisi.....	52
Resim 3.1. Sitrat testi.....	60
Resim 3.2. Jelatin hidroliz testi.....	61
Resim 3.3. Eskülin testi.....	62
Resim 3.4. Üre testi.....	63
Resim 3.5. TSI testi.....	65
Resim 3.6. % 6,5 NaCl'de üreme testi.....	67

Resim	Sayfa
Resim 3.7. <i>Bacillus lentus</i> T10(14) izolatının SMA'daki kuvvetli proteolitik aktivitesi.....	71
Resim 3.8. <i>Bacillus</i> izolatlarının TA besiyerindeki lipolitik aktivitesi.....	72
Resim 3.9. Fluorocult LST Broth'ta <i>E. coli</i>	74
Resim 3.10. <i>S. wiedemanniana</i> uçucu yağının <i>B. licheniformis</i> K11(16) izolatı üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve meydana gelen inhibisyon zon çapı.....	76
Resim 4.1. <i>Bacillus licheniformis</i> K15(1) izolatının SMA'daki kuvvetli proteolitik aktivitesi.....	96
Resim 4.2. <i>Bacillus licheniformis</i> K12(1) izolatının TA'da kuvvetli pozitif lipolitik aktivitesi.....	108
Resim 4.3. <i>B. megaterium</i> K11(1) izolatında kuvvetli lipolitik aktivite.....	108
Resim 4.4. <i>S. wiedemanniana</i> uçucu yağının <i>B. licheniformis</i> K6(23) izolatı üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve meydana gelen inhibisyon zon çapı.....	111
Resim 4.5. <i>S. wiedemanniana</i> uçucu yağının <i>B. mycoides</i> T11(7) izolatı üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve meydana gelen inhibisyon zon çapı.....	112
Resim 4.6. <i>S. wiedemanniana</i> uçucu yağının <i>B. cereus</i> Kşb24(4) izolatı üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve meydana gelen inhibisyon zon çapı.....	112

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda verilmiştir.

Simgeler

Açıklama

β

Beta

°

Derece

kDa

Kilodalton

mda

Mega dalton

μ

Mikron

Kısaltmalar

Açıklama

AOAC

Amerikan Resmi Kimyacılar Birliği

D

Dakika

DNA

Deoksirübonükleik Asit

EMS

En Muhtemel Sayı

FDA

Food and Drug Administration

GR

Gram

Kısaltmalar**Açıklama****ISO**

Uluslararası Standartlar Örgütü

MUG4-Metilumbelliferil- β -D-glukuronid**SMA**

Skim Milk Agar

TA

Tributyryn Agar

UV

Ultra viole

WHO

World Healthy Organization

1. GİRİŞ

Et eksojen aminoasitlerce zengin gıdalar arasında üretimi kolay, hoş giden lezzette, iştah açıcı, açlık duyumunu çabuk gideren, hayati öneme sahip besin öğelerini yeteri miktarda içeren hayvansal bir besindir. Et ve et ürünleri mikroorganizmaların gelişip çoğalabilmeleri için de uygun bir ortamdır. İçerdiği yüksek nem, azotlu besin öğeleri, mineral ve diğer gelişme faktörlerince zengin olmaları, fermente olabilen karbonhidrat (glikojen) içermeleri ve pH değerlerinin bir çok mikroorganizmanın gelişmesine elverişli olması nedeniyle mikrobiyal gelişme sonucu kolayca bozulma özelliğindedir [1].

Genel olarak sağlıklı bir hayvanın kas dokusu sterildir. Canlı hayvanda mikroorganizmalar lenf nodüllerinde toplanmışlardır. Bu nedenle de kontamine olmuş lenf nodülleri kesimden sonra derin dokularda meydana gelen mikrobiyolojik bozulmalarda önemli rol oynar. Kesimden sonra hayvanda mikroorganizmalara karşı korunma mekanizması zayıflar ve durur. Bu durum mikroorganizmaların bütün dokulara yayılmasına neden olur. Bunun yanında kesim, derinin yüzülmesi, iç organlarının çıkartılması ve karkaslarının parçalanması sırasında hayvanın derisi, bağırsakları, kesim aletleri, hava, çalışanların elleri ve elbiseleri, alet ve ekipmanlardan birçok mikroorganizma ete bulaşır. Etin yapısında bulunan enzimler ve mikrobiyal aktivite sonucu etin bileşiminde kesimden hemen sonra değişiklikler meydana gelir. Mikroorganizma aktivitesi sonucu et ve et ürünlerinde kalite kriterleri hızla değişmekte, pastörizasyon ve sterilizasyon gibi ısı işlemlerde süre uzamakta, ekonomik kayıplar artmakta, böyle gıdaların tüketimiyle insanda enfeksiyon ve gıda zehirlenmelerine neden olan önemli sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır.

Bacillus cinsi genel olarak toprak, hava ve su dahil olmak üzere geniş bir yayılım gösterir. Bunun yanı sıra *Bacillus*'lar gıdalara kontamine olduklarında sahip oldukları proteolitik, lipolitik, fosfolipaz ve beta laktamaz enzim aktiviteleri ile gıdaların kalitesini olumsuz olarak etkiler ve bozulmalarına sebep olurlar. Ayrıca sporlu bakteri olduklarından pastörizasyon ısısına da dayanıklıdır.

Gıdalarda bulunan *Bacillus*'ların hepsi patojen deyildir. Yalnız birkaç türü insan ve hayvanlar için hastalık yaparlar. Bu türlerden *B. anthracis* insan ve hayvanlarda şarbon hastalığına, *B. cereus* ise yine insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olur. *B. cereus*'un neden olduğu gıda zehirlenmeleri mikrobiyal gıda zehirlenmeleri içinde önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan araştırmalar bir toprak basili olan *B. cereus*'un gıdalarda bulunduğu zaman hijyenik olmayan koşullarda ve uygun çevre koşullarında bol miktarda üreyerek gıda zehirlenmelerine yol açabildiği bilinmektedir [2].

Diğer *Bacillus* türlerinin neden olduğu gıda zehirlenmeleri de bildirilmektedir (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*). Bu mikroorganizmalar, *B. cereus* tarafından üretilen ve kusmaya neden olan toksine benzer ve ısıya dayanıklı toksin üretmektedirler. *B. subtilis* subtilin adlı bir bakteriyosin üretmektedir. Gözde panaftolmi, iridoksilit, göz yangınlarına neden olurken ekmek ve gıda maddelerinin bozulmalarına yol açar. *B. thuringiensis*, *B. popillae*, *B. sphaericus*, *B. larvae* ve *B. lentimorbus* böcek patojenidir.

Tüm bu nedenlerden dolayı yapılan bu çalışmada çeşitli et örneklerinden *Bacillus* bakterilerinin izolasyon ve identifikasyonunun yapılması, bu örneklerdeki koliform grup mikroorganizma ve *E. coli* sayısının araştırılması, tanımlanan *Bacillus* bakterilerinin proteolitik ve lipolitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi planlanmıştır. Tanımlanan *Bacillus* izolatlarına bir kekik türünden (*Satureja wiedemannia*) elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması bu çalışmanın amaçları içerisinde.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Bacillus cinsi, Bacillaceae familyasına dahil olup, Gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof ve termofilik türleri de vardır. Endospor oluşturlar. Vejetatif hücreler $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ ile $2,5 \times 10 \mu\text{m}$ çapındadır. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır [3].

Bacillus'ların, besi yerlerindeki koloni morfolojisi bakteri türüne göre farklılık gösterir. *B. cereus* grubunda yer alan bakterilerin; *B. anthracis*, *B. mycoides* ve *B. thuringiensis*, koloni özellikleri oldukça değişken olmasına rağmen yine de tanınabilir. Genellikle büyük koloniler (2-7 mm çapında) oluşturlar, koloni sirküler veya düzensiz olabilir, bazen de saç şeklinde “meduza basini” andıran bir görünümde olabilir. Koloniler mat veya granüler yapıdadır. *B. anthracis* ile *B. cereus* kolonileri birbirine benzer. *B. cereus*, kanlı besi yerinde, krem veya beyaz renkte etrafında hemoliz yapan koloniler olusturur. *B. anthracis* kolonileri hemoliz oluşturmaz [4,5].

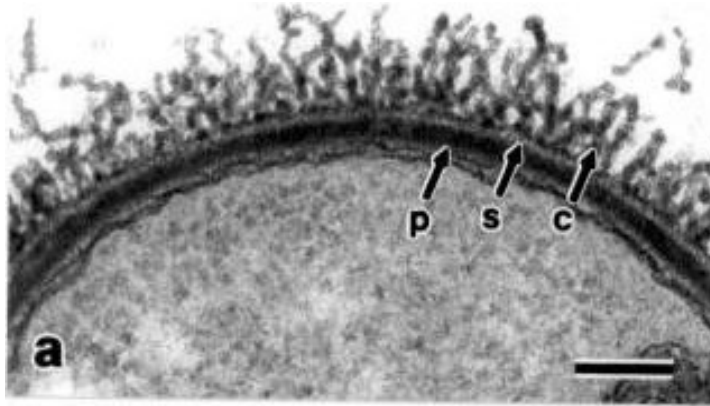
Ellie yakın türü ihtiva eden *Bacillus*'larda, endosporun hücre içindeki yeri farklı olabilir. Spor hücre merkezinde veya uçta olabilir. Vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. Şekeri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmeksizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşumu altında parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G+C mol oranı %32–62'dir.

Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürer. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler [6].

Bacillus'ların bazı türleri güçlü proteolitik özellik gösterir, buna karşın bazı türleri ya zayıf proteolitik özellik gösterir veya hiç göstermez. Aktif proteolitik türler genellikle ekşitilmeden pıhtılaştırılan süt ürünlerinde kullanılır. *B. cereus* bu özelliği gösteren bir türdür. *Bacillus* türleri arasında lipolitik olan bakteriler de bulunmaktadır [7].

Bacillus'ların Yüzey Yapısı

Çoğu Gr (+) bakteri gibi *Bacillus*'ların yüzeyi komplektir. Yüzey yapısı bu bakterilerin tutunma ve direnç özelliklerini sağlamaktadır. Vejetatif hücre yüzeyi; kapsül, S-tabakası, birkaç tabakalı peptidoglikan örtü ve plazma membranının en dış yüzeyindeki proteinlerin oluşturduğu yapıdır [8].



Resim 2.1. *Bacillus* yüzeyi (c: kapsül; s: s-tabakası; p: peptidoglycan) (8)

Kapsül

Bazı bakterilerde hücrenin en dış kısmını oluşturan bölümdür. *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. megaterium* ve *B. licheniformis*'i kapsayan çoğu basil kapsülü poly - D - veya L - glutamik asit içerir. Diğer *Bacillus* türleri, örneğin *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. mycoides* ve *B. pumilis* karbohidrat kapsül oluşturur. Dextran ve

levan yaygındır, fakat daha kompleks polisakkaritler de üretilir. Fazlaca kapsüllü türler agarda mukoid veya yapışkanimsı koloni oluşturlar [8,9].

B. megaterium polipeptit ve polisakkaritten oluşan bir kapsül sentezler. Polipeptit hücrenin ekseni boyunca yerleşmiştir ve polisakkarit hücrenin kutupları ile ekvatorunda yerleşmiştir [8].

B. anthracis kapsülü poly - D - glutamik asit'ten oluşur. Kapsül anthrax'ta virülansın başlıca belirleyici etkenidir [8].

Kapsül *B. cereus* ve *B. thuringiensis* gibi *B. anthracis*'e en yakın türler tarafından sentezlenmez ve bu kriter tür ayrımında kullanılır [8].



Resim 2.2. Negatif boyamada *Bacillus anthracis* kapsülü [8]

S- Tabaka

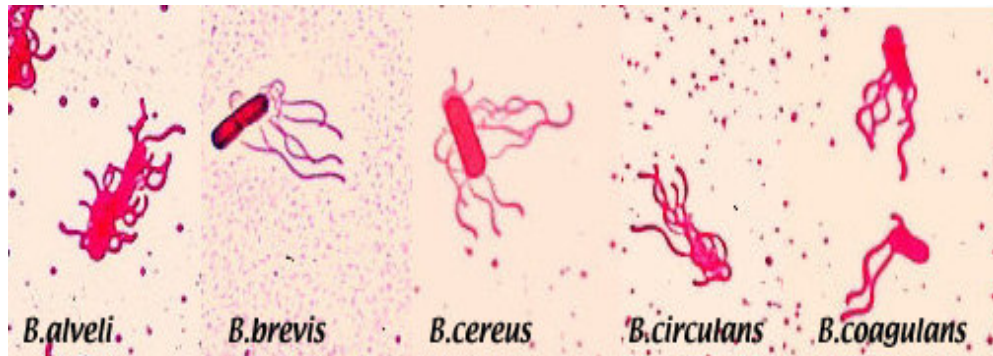
Protein veya glikoprotein alt birimlerinin kristalimsi yüzey tabakası S - tabakası olarak adlandırılır. *Bacillus* cinsi üyelerinde bulunmaktadır. Diğer bakterilerin S - tabakası gibi *Bacillus*'taki fonksiyonları bilinmemektedir [8].

Hücre Duvarı

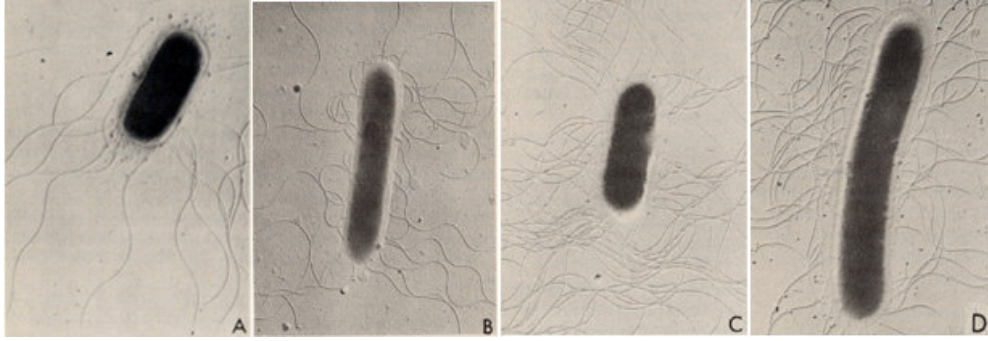
Çoğu Gr (+) bakteride yaygın olan hücre duvar yapısının değişkenliği *Bacillus* cinsinde yoktur. *Bacillus*'ların hücre duvarını, hücre yüzeyini tamamiyle örten yüzey katmanı olan parakristalin oluşturur. Hemen hemen tüm *Bacillus* türlerinin vejetatif hücre duvarı meso-diaminopimelic asit (DAP) içeren peptidoglikandan oluşur. *B. sphaericus* ve bu türe yakın, *B. pasteurii* ve *B. globisporus* türleri istisnadır ve bunun yerine lisin içerir. Tüm *Bacillus* türleri hücre duvarındaki peptidoglikana ek olarak muramik asit kalıntıları ile bağlanmış çok miktarda teikoik asit içerir [8].

Flagella

Bacillus'ların bir çok türü çevresinde peritrik flagellalar bulunması nedeni ile hareketlidir. Çoğu *Bacillus* türü peritrik flagella ile hareketini sağlar. Kemotaksi *B. subtilis*'ta çok çalışılmıştır. *B. firmus*'un flagellar filamenti, 11'e kadar olan çevresel pH değerinde onu daha dayanıklı kıldığı düşünülen oldukça düşük miktarda temel aminoasit içerir [8].



Resim 2.3. Çeşitli *Bacillus* türlerinde flagellar boyama [8]



Resim 2.4. Nutrient agarda fotoğraflanan hareketli *Bacillus* hücreleri a) *B. subtilis*; b) *B. polymyxa*; c) *B. laterosporis*; d) *B. alveli* [8]

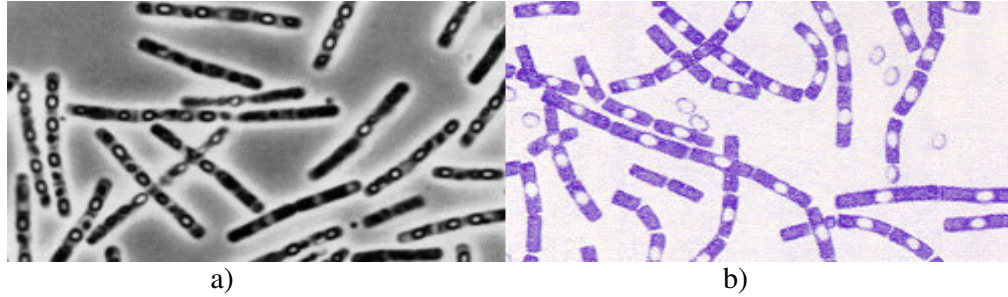
Endosporlar

Sporlar, bazı bakterilerin sitoplazmasının içerisinde ve özel koşullara bağlı olarak oluşan, o bakterilerin çeşitli fiziksel ve kimyasal çevre etkilerine karşı dayanıklı ve nesillerini sürdürme işlevi yapan oluşumlardır. Bakteri sporları üreme elementi değildir [9].

Bu cinsi tanımlayan özelliklerden biri de aerob koşullarda her bakteride bir endospor oluşturmalarıdır. Endosporlar ilk olarak Cohn tarafından *B. subtilis*'de tanımlanmıştır. Cohn *B. subtilis* endosporlarının ısıya olan direncini kanıtlamıştır. Elliye yakın türü ihtiva eden *Bacillus* 'larda, endosporun hücre içindeki yeri farklı olabilir. Spor hücre merkezinde veya uçta olabilir. Vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir [4,5,8].

Endosporlar normal olarak aktif büyüme ve hücre bölünmesi boyunca oluşmaz. Tipik olarak endospor her vejetatif hücrede oluşturulur. Olgun spor oluştuğu ana hücre (sporangium)'nin lizisi ile serbest kalır. Olgun sporların saptanabilir metabolizması yoktur. Bu durum kriptobiyotik olarak tanımlanır. Endosporlar yüksek sıcaklık, irradyasyon, kuvvetli asitler, dezenfektanlar vb. gibi çevresel strese oldukça dirençlidir [8].

Birkaç *Bacillus* türü polipeptit sınıfı antibiyotik üretir. Antibiyotikler, kültürlerde spor oluşturma aşaması başladığında gözlenmiştir [3].



Resim 2.5. *Bacillus* endosporu a) *Bacillus thuringiensis*; b) *Bacillus anthracis* [8]

Bacillus türlerinin tanımlanması ve türler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için spor ve sporangium morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre *Bacillus* türleri 3 grupta toplanmıştır. Birinci grup *Bacillus* türleri kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki grupta sporangia şişmemiştir. Sporlar elips veya silindirik şekilli, santral veya terminal konumludur. Gram pozitiflerdir. A grubu ve B grubu arasındaki fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1 μm 'den küçük, B alt grubunda ise 1 μm 'den büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *B. megaterium* ve *B. cereus*; B alt grubuna örnek olarak *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. coagulans* verilebilir. İkinci grupta yer alan *Bacillus* türlerinde sporangia şişmiştir. Sporları elips, santral veya terminaldir. Bu grupta yer alan türlere örnek olarak *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* verilebilir. Üçüncü grupta yer alan *Bacillus* türlerinde de sporangia şişmiştir. Sporlar küresel, subterminal ve terminal konumludur. *B. sphaericus* bu gruba örnektir [3].

Bazı *Bacillus* Türleri

Birçok türü bulunan *Bacillus*'lar toprak, su ve çeşitli gıdalarda bulunurlar. *Bacillus anthracis* insan ve hayvanlarda şarbon hastalığına neden olur. *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. lentimaorbus*, *B. popilliae* ve *B. sphaericus*'un bazı türleri böcek patojenidir ve *B. thuringiensis* biyoinsektisit olarak kullanılmaktadır. *B. cereus*'un

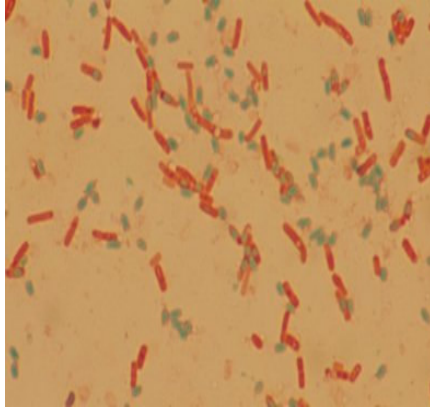
bazı suşları insanlarda gıda zehirlenmesine neden olur. *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus* 4,2 gibi oldukça düşük pH değerlerinde gelişebilirler ve özellikle konserve gıdalarda bozulmalara neden olurlar. *B. stearothermophilus* sporları, bakteri sporları arasında ısıya en dirençli sporlardır. *B. coagulans* (*B. thermoacidurans*) sıcaklığa daha az, ancak asitliğe daha fazla dayanıklıdır. *B. subtilis*, suptilin adlı bir bakteriyosin üretmektedir. *B. licheniformis* basitrasin, *B. polymxa* ise polimiksin antibiyotiklerinin üretiminde kullanılır. *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* bakteriyel α -amilaz enzim üretiminde kullanılmakta olup, amilaz ve amilodekstrini dekstrinlere parçalar [10].

B. subtilis, *B. mesentericus* ve *B. stearothermophilus* ise bakteriyel proteinaz enzimi üretiminde kullanılmaktadır. Bu enzim ise et ve balık etlerinin tenderize edilmesinde (yumuşatılması), şarap ve bira endüstrisinde protein bulunaklığının alınmasında stabilize edici olarak kullanılmakta olup, miso ve soysos üretiminde starter kültür olarak da yararlanılmakta olduğu bildirilmektedir [10].

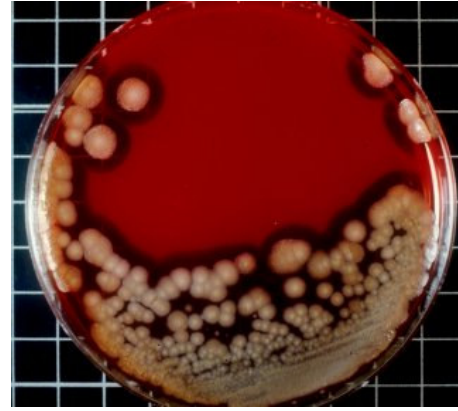
Bacillaceae familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *B. cereus*, toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Baharatlar, süt tozu, tahıl ürünleri (pirinç, patates, ırmik, un gibi) kuru gıdalar, sebzeler, et, soslar, tatlılar bu bakteri sporları ile kontamine olabilirler. *B. cereus* sporları gıdaların pişirilme ısısına dayanıklıdır. Isıtılan gıdalarda bakteri vejetatif hale geçer ve saklanma esnasında çoğalır. Bu gıdaların tüketilmesi sonucu besin zehirlenmelerine yol açar. *B. cereus* besin zehirlenmesi, en sık pirinç ile hazırlanan gıdalarla görülmektedir.

Santral veya subterminal yapıda, elipsoid sporlara sahip olan *B. cereus*, peritrik flagelları sayesinde hareketli ve aerobiktir. Optimum üreme sıcaklığı, suşlara göre 28–35 °C arasında değişmekle birlikte genellikle 30 °C 'dir. Maksimum üreme sıcaklığı yine suşlara göre 37 ile 48 °C arasında değişir. Minimum üreme sıcaklığı da suşa bağlı olarak 10 ile 18 °C arasındadır. Bazı kaynaklarda minimum sıcaklık 4–5 °C, maksimum sıcaklık ise 50 °C olarak verilmektedir. Spor germinasyonu için optimum sıcaklık 30 °C, minimum -1 °C ve maksimum 59 °C'dir. Gelişebildiği pH aralığı 4,9-9,3 olup optimum 7,0' dır. *B. cereus*; lesitinaz, fosfolipaz, jelatinaz,

proteaz, amilaz aktivitesine sahip olup, nitrata indirger ve polimiksine dirençlidir. Emetik, diyarejenik enterotoksini, serolizin ve nekrotik toksinlerini oluşturur. Birçok suşu da %7,5 tuzda üreyebilir. *Cereus* adını tahıl anlamındaki cereal'dan alır [11].



Resim 2.6. *Bacillus cereus* spor boyama [8]



Resim 2.7. Kanlı agarda *Bacillus cereus* kolonileri [8]

B. anthracis: gram pozitif, aerop veya fakültatif anaerop, endospor oluşturan, 1,2-10 μm uzunluğunda ve 0,5-2,5 μm kalınlığında, hareketsiz bir basildir. Kan, doku veya lezyon sıvısından yapılan preparatlarda ikili veya daha fazla zincirler oluşturur. *B. anthracis*'in vejetatif şekillerinin uçları köşeli sonlanır ve uzun basiller şeklinde görülür. Serumlu, kanlı ve bikarbonatlı besiyerlerinde etrafında kapsül oluşur. Basit besiyerlerinde bu kapsül kaybolur. Genel besiyerinde aerob koşullarda kuru, beyaz, mat, düzensiz kenarlı, R tipi koloniler oluştururlar. Kolonilerin görünümü *B. cereus* kolonilerine benzer, fakat daha küçüktür. Bu koloniler merkezden kenara ve tekrar içe doğru kıvrımlar oluşturan dalgalı saç görünümündedir ve bikarbonatlı CO_2 'li ortamlarda M tipinde koloniler oluşturur ve kapsüllüdür. Serbest oksijen varlığında, spor oluşturur, spor genellikle bakterinin ortasında, bazen de subterminal yerleşir. Bakterinin spor formları, vejetatif formun aksine, ısı, soğuk, ultraviyole, kuruluk, yüksek ve düşük pH, kimyasal dezenfektanlar ve diğer bakterilerin metabolik ürünlerine son derece dayanıklıdır. *B. anthracis* sporları 140 °C'de 30 dakikada, 180 °C'de 2 dakikada inaktive olur. Pratikte kullanılan dezenfektanlara dirençlidir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda formaldehid (%5-10), gluteraldehit (2-4), hidrojen

peroksid ve perasetik asit etkilidir. Hemoliz yapmazlar veya zayıf hemoliz oluştururlar. *B. anthracis* hareketsizdir, penisilin ve gamma faja duyarlıdır [4,5].



Resim 2.8. *Bacillus anthracis* gram boyama [8]



Resim 2.9. Kanlı agarda *Bacillus anthracis* kolonileri

B. anthracis, rutin laboratuvarlarda kullanılan besi yerlerinde (kanlı agar, nutrient agar) 37 °C’de kolayca ürer. İzolasyon için, uygun klinik örneklerin kanlı besi yerine ekilmesi ve bir gece inkübasyonu yeterlidir. Klinik örnek dışında kalan materyeller; toprak, toz, kıl gibi, *B. anthracis* izolasyonu amacı ile selektif besi yerlerine

ekilmelidir. Bu amaçla “polymyxin-lizozyme-ETDA-thallos acetate (PLET)” besi yeri kullanılır [5].

Bakteri anaerop koşullarda ve ortamda bikarbonat (HCO_3) varlığında bir polipeptid (poly-g-D-glutamic acid) kapsül oluşturur. Pratikte virulan *B. anthracis* suşlarının kapsül oluşturmaları, bakterinin % 0,7 sodyum bikarbonat içeren nutrient agar ekimi ve % 5-7 CO_2 ortamda bir gece inkübasyonu ile gösterilebilir. Kapsüllü *B. anthracis* kolonileri mukoid görünür. Bu kolonilerden yapılan preparatlarda kapsül, M'Fadyean polikrom metilen mavisini veya çini mürekkebi ile boyanarak gösterilebilir. İn vivo koşullarda da bu bakteri kapsül oluşturur [4,5].

B. anthracis'in üç ayrı antijenik yapısı vardır; polipeptid (poly-D glutamic acid) yapısında kapsülü, polisakkarid yapısında somatik antijeni ve kompleks protein yapısındaki toksindir. Bakteri bu virulans faktörlerini kodlayan iki plazmide sahiptir. Toksin pXO1 ve kapsül ise pXO2 plazmidde kodlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, bu plazmidlerin genetik haritası çıkarılmış, kapsül ve toksin genlerinin lokalizasyonu gösterilmiştir [3,4]. Virulan *B. anthracis* suşları, toksin ve kapsül oluşturan suşlardır. Özellikle çevre kaynaklı bazı izolatlar virulan olmayabilirler. Bu amaçla bakterinin virulans faktörleri (kapsül ve toksin) genlerini göstermede PCR teknolojisi referans laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Virulan *B. anthracis*, deney hayvanını 24-48 saat içinde öldürür. Kandan yapılan yaymanın M'Fadyean yöntemi ile boyanması ile fazla sayıda kapsüllü basiller görülür ve kültür ile de bakteriyolojik doğrulama yapılır [4,5].

B. anthracis sporları insan vücuduna kaşıma, çizik, kesik gibi küçük travmalarla deriden, sporların inhalasyonu ile akciğerlere veya infekte etlerin yenilmesi ile gastrointestinal kanaldan girer. Sporlar makrofajlar tarafından fagosite edilir ve bölgesel lenf bezlerine taşınır. Endospor makrofaj içinde vejetatif hale geçer ve çoğalır. Vejetatif bakteri kapsül oluşturur. Kapsül, fagositoz olayını önler. Böylece enfeksiyonun başlamasında erken safhada önemli rol oynar. Bu bakteriler, makrofajlardan dışarı çıkar, lenfatik sistemde çoğalır ve dolaşım sistemine yayılır.

Dolaşımda bakteri sayısı 10^7 - 10^8 /ml ulaşınca ağır sepsis klinik tablosu oluşturur. Yalnız virulan suşlarda kapsül vardır. Kapsül zayıf antijeniktir. Buna karşı oluşan antikorların koruyucu özelliği yoktur [5,12,13].

B. anthracis'in patojenitesinde en önemli rolü, toksinleri oynar. Toksin protein yapısında olup, üç komponenti vardır; ödem faktörü (EF), protektif antijen (PA) ve letal faktör (LF). Bunların her biri 80-90 kilodalton arasındadır. Serolojik ve biyolojik aktiviteleri Çizelge 2.1'de görülmektedir. Saf toksin komponentlerinin her birinin toksik etkisi gösterilmemiştir. Bu komponentler pXO1 plazmidde kodlanmış olup sinerjistik etki ile şarbonun sistemik etkisini gösterirler. PA ve LF kombinasyonu fare, sıçan ve kobaylarda öldürücüdür [12,14].

Çizelge 2.1. *Bacillus anthracis*'in virulans faktörleri ve immünolojik etkileri [12,14]

Faktör	Toksik etkisi	İmmünolojik etki
Kapsül (poli-Dglutamat)	Antifagositik	Zayıf antijenik,immünojen değil
Ödem faktörü (EF)	İnaktif	Antijenik, immünojen değil
Protektif antijen (PA)	İnaktif	Antijenik, kuvvetli immünojen
Letal faktör (LF)	İnaktif	Antijenik, zayıf immünojen
EF + PA	Lokal ödem	Kuvvetli immünojen
PA + LF	Öldürücü	İmmünojen
EF + PF + LF	Ödem, öldürücü	İmmünojen

B. anthracis in vitro bir çok antimikrobiyallere duyarlıdır. Penisilinler hala ilk tercih edilecek antibiyotiktir. Penisilin allerjisi olanlarda, eritromisin, tetrasiklinler, kloramfenikol ve birinci kuşak sefalosporinler alternatif olarak seçilebilecek antibiyotiklerdir [15,16].

B. subtilis: toz, toprak, gübre, bitki ve hayvanlar ile süt ve sularda bulunan bir bakteridir [9]. 1,5-3,0 µm boyunda, 0,5-0,8 µm eninde, tek tek, bazen zincirler yapan, çomakçık şeklinde bir bakteridir. Peritrik kirpikleri ile hareketli, sporları oval ve subterminaldir. Kapsülü yoktur. Nadiren kapsüllü, hareketsiz ve uzun zincir yapan suşları bulunabilir. Ek büyüme faktörleri olmadan minimal ortamlarda ürerler. Endosporları yaygındır. Vejetatif organizmaları bitki ve hayvan kaynaklı

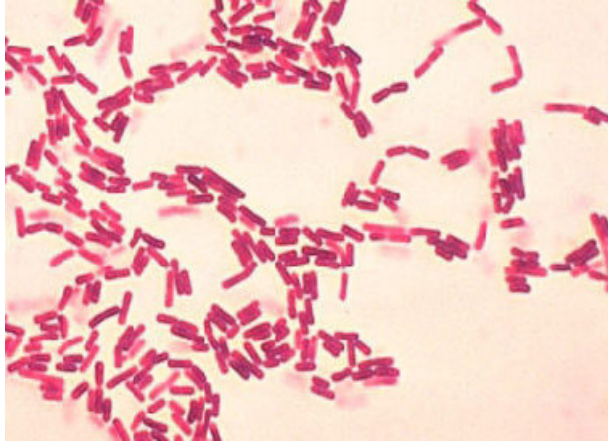
materyallerin erken bozulmalarının çeşitli aşamalarına katılırlar. Aerobik şartlar altında asitsiz gıdalarda çoğalırlar. Genel besiyerlerinde, oda sıcaklığında kolay üreyebilir. Buyyonda bulanıklık, yüzeyde kalın ve buruşuk bir zar yaparak üremesi karakteristiktir. Kolonileri kirli beyaz, gri renkte, mat olup kenarları pürüklü ve R tipindedir. Besiyerinin üzerini buruşuk bir zar gibi kaplar. Bitki dokularındaki pektini ve polisakkaritlerini degrede eder. *B. subtilis* sütte kesilmeye (koagülasyon), patates yumrularında çürümeye neden olur. Et ve balık sularında bulanıklık meydana getirerek ince bir zar tabakası oluşturur [17,18]. Sütü içeceklerin, ekmeğin, sebze ve meyvaların bozulmasında etkindir. *B. subtilis*'in kültür süzüntülerinden elde edilen subtilin adı verilen maddenin bazı bakterilere karşı inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Bakteri aslında saprofit olmakla birlikte doğrudan doğruya doku ve özellikle göz içerisine girmesi sonucunda panoftalmi, iridoksilit gibi göz yangıları meydana getirebilir. *B. subtilis*'in besin zehirlenmesi yaptığından da şüphelenilmektedir [9]. Genellikle gram pozitif bakteri hücrelerinin biyolojisi, biyokimyası ve genetiği hakkındaki bilgilerin çoğu *B. subtilis* çalışmalarından elde edilmektedir [8,17,18].

B. megaterium: Besiyerindeki kolonileri oval veya silindirik, 1,5 µm çapındadır. Kısa ikili zincirler oluştururlar. Ek büyüme faktörleri olmaksızın minimal ortamlarda ürerler. Karbonhidratlı besiyerlerinde kolonileri 3,0 µm veya daha büyüktür. Çoğu suşları hareketlidir. Sporları küçük ve ovaldir. Glikoz agarda mukoid koloniler oluştururlar. Arabinoz, ksiloz ve mannitolden asit oluşturur, jelatini 22 °C'de sıvılaştırırlar [8,17,18].

B. licheniformis: Besiyerinde opak, saç benzeri koloniler oluştururlar. Glikozu aerobik koşullarda fermente ederek oluşturduğu 2,3- butandiol ve gliserol en önemli karakteristik özellikleridir. Sukroz ve rafinozdan ekstrasellüler olarak levan üretirler. *B. anthracis* gibi aynı tip poly-D-glutamat kapsül üretir. Demir içeren karbonhidratlı besiyerlerinde kırmızı pigment oluştururlar. Eskimiş kültürlerinde bu renk kahverengine dönüşür. Uygun olmayan koşullarda spor oluştururlar. Sporları toprakta bulunur ve ısı işlemlerine dayanıklıdır. Pek çok gıda maddesinde 30-50

°C’lerde vejetatif olarak üreyebilirler. Tıpta kullanışlı bir antibiyotik olan Basitrasin’in endüstriyel kaynağıdır [8,17,18].

B. coagulans: Smith et. al., (1952) tarafından iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta oval veya silindir şeklinde sporları olan şişkin sporangiumları fark edilmeyen *B. coagulans*, ikinci grupta sporangiumları belirgin oval sporlu *B. coagulans* türleri yer alır. Laktoz pozitif ve glikozu fermente ederek laktik asit, az miktarlarda da 2,3-butandiol, asetoin, asetik asit ve etanol üretir. Asidofilik suşları içermektedir. Sporları toprakta diğer *Bacillus* türlerine göre nadirdir. Konserve domates salçası, domates suyu gibi asitli gıdalarda hızlı ürerler. Sütte bulunduğunda süt proteinlerini koagüle ederler. pH 4,5-5,5’de 45-55 °C’lerde aerobik ve anaerobik olarak ürerler [8, 17,18].



Resim 2.10. *B. coagulans* gram boyama [8]

B. badius: Çoğunlukla zincir oluşturan çomak şeklinde bakterilerdir. Uçları küt ve düzdür. Besiyerinde saç gibi ve rizoid görünümde ve saçaklı ürerler. Deniz ürünlerinden, çeşitli gıdalardan, toz, toprak, çöplerden izole edilmiştir [8,17,18].

B. brevis: Pek çok suşunun minimum besin ihtiyacı aminoasitlerdir. En sık olarak topraktan ve çeşitli gıdalardan izole edilirler. Sporları eliptiktir, glikozdan yavaş bir şekilde asit oluşturur veya asit oluşumu hiç yoktur [8,17,18].

B. stearothermophilus: En önemli ayırt edici özelliği 65 °C’de dahi üreyebilmesidir. Aside toleranslıdır. Pek çok suşu glikozlu besiyerinde, oksijensiz ortamda ve pH 5,3-4,8’de üreyebilir. Anaerobik fermentasyonla laktozdan laktik asit, formik asit, asetik asit ve etanol üretir. Sporları ısı işlemine oldukça dayanıklıdır. Buna karşılık vejetatif hücreleri uygunsuz koşullara duyarlıdır. Soğukta canlılıklarını kaybederler. Sporları toprakta, termal bölgelerde, derin okyanus sedimentlerinde bulunabilir. Vejetatif hücreleri pek çok gıda maddesinde yüksek sıcaklıkta ve pH 5,0’de hızla ürerler. Gıdalara bulaştığında lezzet bozukluklarına neden olurlar. Toprak, kaplıca, çöl kumu, arktik sular, okyanus sedimentleri, gıda ve çürümüş organik maddeli gübrelerde bulunur [8,17,18].

B. pumilis: Sporlarına her yerde rastlanır. Toprakta *B. subtilis*’ten daha sıklıkla bulunur. Kolonileri değişik besiyerlerinde farklı morfolojilerde ürer. Biotinli ve aminoasitli ortamlarda daha kolay üreme gösterir [8, 17,18].

B. circulans: Çoğu suşun terminal ve subterminal sporları vardır. Nutrient agardaki kolonileri incedir. Belirgin rizoid kolonileri vardır. Bazı türleri selülozu hidrolize etmektedir. Birçok karbonhidrattan gaz oluşturmada asit oluştururlar. Glikozlu besiyerinde anaerobik koşullarda üretilirler. Sporlarına toprakta rastlanır [8,17,18].

B. sphaericus: Nutrient agarda agar yüzeyinde yayılma gösterirler. Bazı suşları pembe koloniler oluşturur. Nutrient, jelatin ve litmus milkde proteolitik aktivite gösterirler. Sporları toprakta bulunur. Toprak, deniz, tatlı su sedimentleri, süt ve yiyeceklerden izole edilir [8,17,18].

B. firmus: Morfolojisi *B. subtilis*’e benzer. Glikozdan asit oluştururlar. Toprakta bulunurlar. Pigmentli suşları tuzlu bataklıklarda oluşur [8,17,18].

B. alcalophilus: Alkalifil’dir. Alkali şartlara toleranslıdır ve pH 7’de üreyemez. pH>10’da üreyebilmektedir. 0,7-0,9 µm çapında ince, çubuk şeklinde bir bakteridir.

Sporları oval ve subterminaldir. Glikoz üzerine etkisi azdır veya hiç etki etmez. Zayıf proteolitik aktivite gösterir [8,17,18].

B. laterosporus: En önemli özelliği mekiğe benzer yapıda ve bir uçta sporunun olmasıdır. Nutrient agarda opak ve nemli koloniler oluşturur. Nadiren izole edilir, fakat ölü bal arısı larvalarında, toprak, su ve antiasitlerde bulunmaktadır [8,17,18].

B. alvei: Tipik suşları agar yüzeyine dağılarak “hareketli koloniler” görüntüsünü verir. Glikozlu kompleks besiyerlerinde anaerobik olarak üreyebilir. Toprakta, bal arısı larvalarından ve petek balından izole edilmektedir. Bir böcek patojeni olarak sınıflandırılmamaktadır [8,17,18].

B. lentus: *B. firmus*’a benzer, fakat beslenme şekli daha versatildir. *B. firmus*’dan üre, jelatin ve kazein testleri ile ayrılır. Toprakta, gıdadan ve baharatlardan izole edilmiştir [8,17,18].

B. pantothenicus: Sporları terminal ve ovaldir. Büyüme faktörü olarak pantotenik asit gereksinimi vardır. Glikozlu besiyerinde iyi ürer. Toprakta bulunur [8,17,18].

B. insolitus: Üreme ve sporulasyon 0 °C’de meydana gelir. Sporları yuvarlak veya silindirik 0,7-1,4 µm çapındadır. Vejetatif hücreleri kısa ve tombuldur. Arktik topraklarda bulunur [8,17,18].

B. mycoides: *B. cereus*’a benzer, fakat hareketsizdir. Besiyerinde rizoid koloniler oluşturur. *B. anthracis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* türlerine çok yakındır [8,17,18].

B. azotoformans: Gram negatiftir. Son elektron alıcısı olarak NO₃, NO₂, SO₄ veya fumarat’ı kullanarak anaerobik solunum yapar. Toprakta denitrifikasyonu sağlayan bakteridir. NO₃, NO₂ ve N₂O’ye çevirir [8].

B. fastidiosus: Enerji kaynağı olarak sadece ürik asit, allantik asit veya allantoin’i kullanır. Toprakta ve kümes hayvanlarının bulunduğu ortamdan izole edilir [8].

B. globisporus: Yuvarlak spor oluşturur ve *B. sphaericus* türüne yakındır. Toprak ve nehir suyunda bulunur [8].

B. larvae: Böcek patojenidir. Bal arılarında hastalığa neden olur. Bal peteklerinden izole edilir. Ayrıca enfekte arıların kovani civarındaki topraklardan da izole dileyebilir, fakat diğer kaynaklardan izole edilmez. *B. lentimorbis* ve *B. popilliae* gibi tipik olarak katalaz negatiftir. Büyüme faktörü olarak tiamine ihtiyaç duyar. Bu nedenle nutrient brothda üreyemez [8].

B. lentimorbis: Beslenme şekli olarak daha seçicidir. *B. popilliae*'den daha yaygın bulunmaktadır. Japon kınkanatlı böceği ve mayısböceklerini enfekte eder. Ölü larvalardan veya enfekte olan bal peteklerinden izole edilir [8].

B. popilliae: Japon kınkanatlı böcekleri için patojendir. *B. lentimorbis* ile birlikte Japon kınkanatlı böceği ve Avrupa mayısböceklerinde hastalık etkenidir. Böcek hemolinfinde fazlaca spor üretiminden dolayı larva süte benzer. Belirgin parasporal kristali bu bakteriyi *B. lentimorbis*'den ayırır. Japon kınkanatlı böceklerinin hemolinfinden izole edilir [8].

B. macerans: Nutrient agardaki kolonileri ince, yuvarlak, glikoz agardaki kolonileri oldukça opaktır, ancak mukoid deyildir. Çoğu suşu anaerobik şartlar altında N_2 'yi fikseder. Karbonhidratları fermente ederek etanol, aseton, formik asit, asetik asit, CO_2 ve H_2 oluştururlar. Bitki dokularındaki pektin ve polisakkaritleri ayrıştırırlar. Selüloza az etki ederler. Sporları *B. polymxa*'ya benzer. Toprakta seyrek olarak izole edilir. Bitki materyallerinde hızlı çoğalırlar. Bazı türleri kısmen termofiliktir. pH 3.8'de konserve meyvelerde de bulunmaktadır [8,19].

B. macquariensis: 0°C'de ürer ve spor üretir. Diğer özellikleri *B. circulans*'a benzer [8].

B. marinus: 5-30 °C'de ürer, fakat 37 °C'de üremez. Üremesi için Na⁺ zorunlu bir gereksinimidir. Rutin olarak deniz sedimentlerinden izole edilir [8].

B. pasteurii: Üreyi amonyum karbonata bilinen herhangi bir bakteriden daha aktif bir şekilde dönüştürür. Büyümleri için alkali ortam (pH 9) gereklidir. Toprak, su, lağım suyunda ve pisuarlarda bulunur [8].

B. polymxa: Nutrient agardaki kolonileri ince, ameboid, glikoz agardaki kolonileri mukoid ve mat yüzeylidir. Kolonileri mukoit, sümüksü ve yayılma eğilimindedir. Sükrozdan çok fazla levan kapsül sentezler. Glikozu fermente ederek 2,3- butandiol, etanol, CO₂ ve H₂ oluştururlar. Bitki dokularındaki pektin ve polisakkaritleri ayrıştırırlar. Selüloz üzerindeki etkisi azdır. Anaerobik koşullarda nitrojeni fikse ederler. Sporları birbirine paralel ve yıldız şekline benzer. Sporlara çok geniş bir alanda rastlamak mümkündür. Çoğalmaları başlıca çürüten vejetasyonlarda gerçekleşir [8,19].

B. schlegelii: Termofildir. Yüksek G+C içerikleri *B. acidocaldarius* ve *B. sphaericus*'a benzer. Bakteri CO₂ veya CO'nun birinden karbon alırken H₂ veya CO'nun oksidasyonundan enerji elde eder. Göl sedimentlerinden ve şeker fabrikası atıklarından izole edilir [8].

B. thuringiensis: Lepidopter böcekler için patojenliği ve spor formasyonu ile ilgili parasporal kristal üretimiyle *B. cereus*'dan ayrılır. Larva bağırsağında protein (kristal) toksiktir. Spor ve kristalleri bahçe ve kültür bitkilerine zarar veren lepidopterlerin biyolojik kontrolünde BT adıyla satışa sunulmaktadır. Bt, toksik kristal üretme yeteneğiyle birlikte *B. cereus*'a spontane olarak transfer edilen bir plazmitte kodlanmıştır. Bazı taksonomistler bu durumu bu iki bakteri arasında yakın genetik bağın bir kanıtı olduğunu iddia etmektedirler [8].

Bacillus enfeksiyonları

Bacillus türleri tabiatta saprofit olarak bulunmaktadırlar. *B. anthracis* ve *B. cereus* dışında kalan türler primer insan patojeni değildirler. Ancak travma, yanık ve değişik şekilde immünitesi baskılanmış hastalarda potansiyel patojendirler. Bir çok *Bacillus*'un hastalık patogeneğinde rol oynayan antimikrobiyal özellikte madde, enzim, pigment ve bir kısmında toksin gibi hücre dışı madde salgıladıkları gösterilmiştir [20].

Şarbon

B. anthracis insan ve hayvanlarda anthrax, şarbon, çoban çıbanı denilen hastalığın etkenidir. Giriş kapısına göre deri şarbonu, akciğer şarbonu, bağırsak şarbonu ve sepsisemiye sebep olur. Evcil ve yabani hayvan hastalığı olan anthrax (özellikle inek, koyun, at, katır ve keçi gibi herbivor hayvanların), insanlar hastalıklı hayvanların et, kemik, deri, kıl ve dışkısı ile temas ettiğinde enfekte olur. Hastalık *B. anthracis* sporlarının zedelenmiş deri, mukozalar ve seyrek olarak solunum yolu ile akciğerlerden organizmaya girmeleri sonucunda oluşur. *B. anthracis*'ler bulundukları yerden lenfa yolu ile kana yayılma ve orada çoğalma eğilimindedirler [8,9].

Şarbon dünyada gittikçe azalan enfeksiyon hastalıklarından biridir. Henüz tamamen silinememiştir. Dünyada halen her yıl 20000-100000 arasında insan şarbonu görüldüğü tahmin edilmektedir [5,21]. Batı dünyasında son 20 yıl içinde insan şarbonu oldukça azalmıştır [22]. Şarbon ülkemizde endemik bir hastalıktır. Görülme sıklığı gittikçe azalmaktadır [23]. Enfeksiyon insanlara infekte hayvanlardan direk yolla veya indirek yolla bulaşır. Bulaşma kaynaklarına göre enfeksiyon *endüstriyel*, *tarımsal* ve *laboratuvar* kaynaklı olabilir. Endüstriyel kökenli şarbon, *B. anthracis* sporları ile kontamine hayvansal ürünlerin; keçi kılı, yün deri, post ve kemik gibi, sanayide işlenmesi esnasında oluşur. Sporların deriye bulaşması ile deri şarbonu veya solunması ile akciğer şarbonu oluşur. Gelişmiş ülkelerden bildirilen şarbon olguları, genellikle enfeksiyonun endemik bulunduğu ülkelerden ithal edilen hayvansal

ürünlerden kaynaklanmaktadır. Hayvansal ürünlere uygulanan dekontaminasyon işlemleri ile infeksiyon riski oldukça azaltılmıştır [5,21].

Tarımsal kökenli şarbon, infekte hayvanlarla direk temas sonucu gelişir. Ölen hastalıklı hayvanların kesilmesi, derisinin yüzülmesi, etinin kıyılması sonucu direk temasla deri şarbonu veya infekte etlerin yenilmesi ile gastrointestinal sistem şarbonu gelişir [21]. Ülkemizde görülen şarbon olguları genellikle tarımsal kökenlidir. Hayvancılıkla uğraşanlar, kasap ve veteriner hekimler şarbon yönünden risk gruplarını oluşturmaktadırlar [24].

İnfeksiyon sineklerle de mekanik olarak bulaşabilir. Zimbabwe’de 1979-1980 yıllarında çıkan büyük epidemide ahır ve at sineklerinin de büyük rol oynadığı belirtilmektedir. İnsandan insana bulaş çok nadirdir. İnfekte yara ve akıntı ile direk ve indirek temas sonucu infeksiyonun bulaşma riski vardır [5,21].

Laboratuvarlarda bulaş nadirdir. Dikkatsizlik sonucu infeksiyon gelişebilir. Oldukça tehlikelidir. Nisan 1979’da, Sverdlovsk (Rusya) şehrinde çıkan 64 kişinin ölümü ile sonuçlanan, 96 kişiyi kapsayan şarbon salgınının, biyolojik silah etkeni olarak çalışılan bir laboratuvar da kaza sonucu ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Bu tahmin Ruslar tarafından doğrulanmamıştır [5].

Şarbon sporlarının organizmaya giriş kapısına göre üç klinik formda hastalık oluşturur; 1-*deri şarbonu*, 2-*akciger şarbonu*, 3-*gastrointestinal şarbon*. Bu yerleşim yerlerinden herhangi birinden lenfohematojen yolla yayılım ile sepsis ve menenjit gibi ağır, öldürücü klinik tablolar gelişebilir [5,12,21].

Deri Şarbonu

İnsanlarda hastalığın en yaygın formu, genellikle yaralı deri veya mukoza membranı yoluyla edinilen deri şarbonudur [8]. Şarbon sporlarının kesik, kaşıma veya sinek ısırması gibi küçük travmalarla ile deriye inokülasyonu, deride küçük papül şeklinde lezyon çıkıncaya kadar geçen süre genellikle iki veya üç gündür. İnkübasyon süresi

bir-yedi gün arasında değişir. Hastalık inokülasyon yerinde kaşınma ve yanma ile başlar. Kırmızı ufak bir makül, kabarır ve papül görünümünü alır. Bir-iki gün içinde lezyon genişler, üzerinde vezikül oluşur. Vezikülün ortası çökük, içi sıvı ile doludur. Bu lezyonun etrafı ödemli ve eritemli bir alan ile çevrili olup ağrısızdır. Birkaç gün içinde vezikül içindeki sıvı bulanır, koyu bir renk alır. Mavi-siyah renge dönüşür. Vezikül patlar, ortada keskin kenarlı, ortası çökük siyah bir ülser oluşur. Bazen bu nekrozu çevreleyen ödemli doku üzerinde küçük veziküller gelişir. Bunlar da nekroze olur, siyahlaşır ve primer lezyonla birleşir. Bu lezyona şarbon püstülü adı verilir (eski adı pustula malign). Çapı altı-dokuz cm kadar ulaşabilir. Lenf düğümü şiş ve ağrılıdır. Belirtiler hastalığın şiddetine göre değişir. Lezyon genellikle bir-üç cm çapındadır. Nekroz tamamlandıktan sonra siyah bir kabuk teşekkül eder. Etrafındaki ödemin azalması ile kabuk ayrılmaya başlar, iki-üç hafta içinde de düşer [5,12].

Şarbon lezyonları deride genellikle yüz, boyun, eller ve kollar gibi vücudun açık yerlerinde yerleşir. Aynı hastada bazen birden fazla lezyon olabilir. Ayrıca vücudun diğer anatomik yerlerinde de lezyonlar seyrek de olsa yerleşebilir. Bütün dünyada görülen insan şarbonunun %95'ini deri şarbonu oluşturmaktadır [25].

Akciğer şarbonu

Hastalığın diğer formu olan akciğer şarbonu, genellikle hayvanın temas edilen kıl veya derilerindeki spor içeren tozun teneffüsünden kaynaklanır. Semptomlar, iki-beş gün içinde hafif ateş, kırgınlık ve yorgunluk şikayetleri ile başlar. Başlangıç belirtileri hafiftir, iki-üç gün sürer. Bunu akut hastalık belirtileri takip eder. Hastanın ateşi yükselir, nabızı süratlenir ve öksürük gelişir. Hastada şuur bulanıklığı ve koma gelişerek ölümle sonuçlanır [8].

Gastrointestinal Şarbon

Bağırsak şarbonu deri şarbonuna benzer, fakat intestinal mukozada meydana gelir. Deri şarbonundaki gibi bakteri lezyondan girerek mukozayı istila eder. Bakteri

mukozal lezyondan lenfatik sisteme doğru yayılır. Bağırsak şarbonu enfekte hayvanın az pişmiş etinin yenmesinden kaynaklanır. Bağırsak şarbonunun enfeksiyon kaynağı *B. anthracis* pozitif sporları ile bulaşmış besin maddeleridir. Özellikle çiğ tüketilen ve sonradan sporları bulaşmış et, süt ve diğer besin maddeleri oldukça tehlikelidir. Klinik gastrointestinal anthrax nadirdir, fakat enfekte olmuş hayvanın etinin yenmesiyle ilgili olarak salgın şeklinde meydana gelebilir [8,17,18].

Şarbon lezyonları, gastrointestinal kanalın her yerinde görülebilir. Semptomlar genellikle kontamine gıdaların yenilmesinden iki-beş gün sonra ortaya çıkar. Gastrointestinal şarbonda iki klinik form tanımlanmaktadır; orofaringeal şarbon ve barsak şarbonu.

Orofaringeal şarbon: Lezyon, ağız mukozası, dil, tonsil, farinks arka duvarında yerleşebilir. Klinik tablo, yutma güçlüğü, boğaz ağrısı, boyunda ağrılı lenfadenit, yüksek ateş ve toksemi ile karakterizedir. Sepsis ve toksemi sonucu hastalar kaybedilir. Tedaviye rağmen ölüm oranı % 50 dir [26].

Barsak şarbonu: Lezyon, barsakta en sık terminal ileum veya çekum bölgesinde yerleşir. Mide, duodenum ve proksimal ileumda daha az oranda yerleşir. Hastalarda bulantı, kusma, karın ağrısı, kanlı ishal vardır. Semptomlar başladıktan iki-dört gün sonra süratle asit gelişir. Klinik tablo gittikçe kötüleşir. Ağır toksemi, sepsis ve septik şok gelişerek hastalar kaybedilir [5,12].

Şarbonun her üç klinik formu da öldürücüdür. Deri şarbonu kendiliğinden düzelebilir. Deri şarbonu nadiren sepsise yol açar. Tedavi edilmeyen olguların %10-20'sinde sepsis gelişir ve ölümle sonuçlanır. Tedavi ile bu oran %0-3'e inmiştir. Akciğer şarbonu hemen hemen daima öldürücüdür. Gastrointestinal şarbonda ise ölüm oranı tedaviye rağmen %25-75 arasındadır [5,12,21,27,28].

Şarbon için risk altında olan kişilerin, kontamine materyallerin infeksiyöz olduğunun farkında olmaları korunma için esastır. İnfeksiyon kontrol programı, şarbon yönünden risk grubunun eğitimi, kontamine materyallerin dekontaminasyonu,

endüstriyel alanda hayvansal ürünleri işleyen, *B. anthracis* sporları ile bulaş olasılığı olan ekipmanların düzenli temizliğinin sağlanması, işçilerin iş elbisesi kullanmaları ve el yıkama alışkanlığının yerleştirilmesini kapsamalıdır [21].

B. anthracis sporları toprakta uzun süre canlılığını ve infektivitesini korur. Bu nedenle tarımsal alanda, şarbonun endemik bulunduğu bölgelerde korunmada en etkili yöntem hayvanların ve risk altında olan insanların aşılanmasıdır. Ayrıca hastalıktan ölen hayvanların etinin yenilmemesi ve çevreyi yeniden infekte etmemesi için de karkasın derin gömülmesinin sağlanması gerekir [14].

Besin Zehirlenmesi

Bacillus'lar arasında en sık besin zehirlenmesi yapan tür *B. cereus*' tur. *B. cereus* iki klinik formda besin zehirlenmesi oluşturur. İshal ile seyreden klinik form; inkübasyon süresi uzundur. Semptomlar kontamine gıdaların yenilmesinden 8-16 saat sonra ortaya çıkar. Hastalarda, kramp şeklinde karın ağrısı, sulu ishal vardır. Semptomlar 24 saat içinde düzelir. *B. cereus*' a bağlı kusma ile seyreden besin zehirlenmesinde inkübasyon süresi 1-6 saat arasında değişir. Hastalık bulantı, kusma, kırgınlık ile karakterizedir. Bazen de ishal olabilir. Semptomlar genellikle 24 saat içinde düzelir. Diğer *Bacillus* türlerinden *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. pumilus*'un da sık olmamakla birlikte besin zehirlenmelerine neden olduğu bildirilmiştir [4,20,29].

B. cereus'un çok sayıda alınması ile bireylerde gıda zehirlenmesi görülebilir. Gıda zehirlenmeleri, gıdadaki bakteri sayısı 10^6 /g olduğunda ortaya çıkmaktadır [11]. *B. cereus* zehirlenmesinde aracı gıdalar olarak, pişmiş pirinç, makarna, et, kümes hayvanları, sebze yemekleri, çeşitli çorbalar, pudıngler, baharat ve soslar sayılabilir. Ayrıca, toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabilen *B. cereus*, sporlu bir bakteri olduğu için et ve süt ürünlerinde de bulunabilir. Bu zehirlenmeler özellikle *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdalar pişirildikten sonra yeterince ve hızlı soğutulmadıklarında veya gıdaların hazırlanması ile tüketimi arasındaki süre uzadığında, canlı ve ısıya dirençli olan sporların

çimlenmesi sonucu mikroorganizma çoğalıp, gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde toksin oluşturabilir [30].

Bacillus türleri ile oluşan besin zehirlenmeleri bir çok ülkede değişen oranlarda görülmektedir. Her mevsimde görülebilen *B. cereus* besin zehirlenmesi, gıda zehirlenmeleri arasında Japonya ve İskoçya’ da %1, Hollanda’da %22 olarak bildirilmektedir [14,20].

Ülkemizde de *B. cereus*’a bağlı besin zehirlenmesi bildirilmiştir [31].

B. cereus, ilk defa Hauge (1950–1955) tarafından Norveç'te 600 kişiyi etkileyen 4 ayrı gıda zehirlenmesi vakasında, etiyolojik etmen olarak bildirilmiş, zehirlenmeye neden olan gıdanın, hazırlandıktan sonra bir gün bekletilmiş vanilyalı sos olduğu saptanmıştır. Bu olaydan sonra diğer birçok Avrupa ülkesinde de *B. cereus* vakası tespit edilmiştir. 1980 yılında *B. cereus* kaynaklı 9 gıda zehirlenmesi, 1981 yılında 8 gıda zehirlenmesi vakası, Hastalık Kontrol Merkezine rapor edilmiştir [32].

B. cereus iki farklı toksin oluşturur. Bunlardan birisi 40 kDa ağırlığında ısıya dayanıklı (Stabil Toksin; ST) bir protein olan enterotoksindir. Gıda zehirlenmesine neden olan bu toksin 126 °C’de 90 dakikada inaktif hale gelir. Diğer toksin ise 5–7 kDa ağırlıkta, ısıya duyarlı (Labil Toksin; LT) olan bir peptittir. 60 °C’de birkaç dakikada tahrip olur. *B. cereus* türündeki bütün suşlarının toksin yapmadığı, belli serotiplerin toksin oluşturduğu bilinmektedir. *B. cereus* gıda zehirlenmesine neden olan ekstrasellüler toksin, ortamdaki bakteri sayısı belirli bir düzeye ulaştıktan sonra saptanabilir. Bakteri, toksini logaritmik faz sırasında sentezler ve salgılar. Yapılan çalışmalarda bu bakterinin 18–44 °C arasında toksin sentezlediğini ve 45 °C ’de üremesinin durduğu tespit edilmiştir [11].

B. cereus’un toksini pronaz enzimlerine duyarlı olup, 37 °C’de 60 dakikada bu enzimlerin %0,01’lik dozu ile inaktif hale gelmektedir. Toksin, 45 °C’de 30 dakikada aktivitesini kaybetmez ancak 56 °C’de inaktif hale geçer [11].

B. cereus'da bulunan stabil (emetik) ve labil (diyarejenik) toksinler iki farklı tip zehirlenmeye neden olur. Bunlardan biri “akut başlayan kusma tipi sendrom” olup daha çok pişmiş pirinç ve pirinçli gıdalarda oluşan toksinle ilişkilidir. Kusturucu toksin olarak isimlendirilen bu toksin ısı ile, pH'nın yanı sıra tripsin, pepsin enzimlerine ve proteolize dayanıklıdır ve antijenik özelliği yoktur. Kontamine gıda yenildikten 1-5 saat sonra bulantı ve kusma ile seyreden besin zehirlenmesi ortaya çıkar. Emetik toksinin akut karaciger yetmezliği yaptığı da bildirilmiştir [13,33,34].

Diğer hastalık tipi ise “uzun sürede gelişen diyare tipi sendrom” olarak bilinmektedir ve daha geniş bir gıda grubu ile ilişkilidir. Bu gıdalar arasında; mısır ve mısır nişastası başta olmak üzere tahıl içeren gıdalar, patates püresi, sebzeler, kıyma, bazı et ürünleri, puding ve çorbalar sayılabilir. Diyare yapıcı toksin olarak bilinen bu toksin, protein yapısında olup, tripsin ve pronaz enzimleri ile ısıya karşı duyarlıdır. [4,12,13].

B. cereus grubu içinde yer alan *B. myocoides* ve *B. thuringiensis*' de ishal oluşturan toksin üretirler ve gastroenteritten sorumlu olabilirler [4,13].

Nispeten daha hafif seyreden diyare tipi *B. cereus* gıda zehirlenmesinde inkübasyon süresi 8-16 saat arasında değişmekte olup, genelde 12–13 saattir. Hastalık, 6–12 saat sürer ve belirtileri bulantı (kusma çok seyrek), kramp şeklinde karın ağrısı ve sulu ishaldir. Genellikle ateş görülmez. Bu tip *B. cereus* zehirlenmesi *C. perfringens* gıda zehirlenmesine benzerlik gösterir. Daha ağır seyreden emetik tip (kusma tipi) *B. cereus* gıda zehirlenmesinde ise inkübasyon süresi 1–6 saat arasında değişmekte olup, genel olarak 2–5 saattir. Bu zehirlenme şekli *S. aureus* gıda zehirlenmesine benzerlik gösterir [32].

Göz İnfeksiyonu

En sık göz infeksiyonu *B. cereus* ve *B. subtilis*'de bildirilmiştir. *B. cereus*, genellikle gözle ilgili lokal enfeksiyonlara zaman zaman neden olur. *B. cereus* gözü enfekte eden en zararlı organizmalardan birisi olup konjonktivit, keratit, iridoksit, dakriyosistit, apse, panoftalmi'ye yol açar [8]. Bu bakterilerle oluşan göz infeksiyonları süratle ilerler, inokülasyondan 12-48 saat içinde, endoftalmit veya panoftalmit gelişir. Geriye dönüşü olmayan görme kaybına yol açar. Gözün toz ve toprak ile kontaminasyonu, gözün penetran travmaları (özellikle sanayi çalışanlarında demir parçaları ile göz travmaları) veya kontak lens, göz içi lens uygulamaları sonucu gözün direkt *Bacillus* spp. ile bulaşı enfeksiyona yol açar [13,35].

B. thuringiensis, biyolojik insektisit olarak kullanılmaktadır. Kazara göze sıçraması sonucu sağlıklı kişilerde göz infeksiyonuna yol açmaktadır [36].

Endokardit ve Sepsis

Bacillus türleri nadiren endokardit etkenidirler. Damariçi ilaç bağımlılarında endokardit iyi bilinen bir komplikasyondur. Eroin ve injeksiyon ekipmanları bu bakterilerin bulaş kaynağıdır. *Bacillus* türleri arasında en sık endokardit etkeni *B. cereus*'dur. *Bacillus* türlerine ait bakteriyemi; damar içi ilaç bağımlılarında, kanserli hastalarda, damariçi kateteri olan hastalarda görülmektedir [13,37,38].

Diğer İnfeksiyonlar

Bacillus türlerine bağlı bütün sistemlerde infeksiyon bildirilmiştir. Bunlar; pnömoni, ampiyem, beyin apsisi, menenjit, sant infeksiyonu, protez eklem infeksiyonu, yara infeksiyonu, yanık infeksiyonu gibi [13,39,40].

Önemli *Bacillus* türleri ve oluşturduğu infeksiyonlar Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı *Bacillus* türleri ve oluşturdıkları infeksiyonlar

İzolat	Klinik tablo
<i>B. anthracis</i>	Şarbon, sepsis, menenjit
<i>B.(paenibacillus)alvei</i>	Sepsis, menenjit, pnömoni, ampiyem, protez kalça infeksiyonu, yara infeksiyonu
<i>B. brevis</i>	Bakteriyemi, kornea infeksiyonu, besin zehirlenmesi
<i>B. cereus</i>	Besin zehirlenmesi,yara infeksiyonu, bakteriyemi,sepsis, pnömoni, ampiyem, endokardit, osteomiyelit, oftalmit, menenjiit, beyin apsesi, akciğer apsesi,emetik toksine bağlı karaciğer yetmezliği
<i>B. circulans</i>	Menenjit, sepsis, endokardit
<i>B. coagulans</i>	Kornea infeksiyonu, bakteriyemi
<i>B. licheniformis</i>	Besin zehirlenmesi, sepsis, oftalmit, peritonit
<i>B. pumilus</i>	Rektal fistül infeksiyonu
<i>B. sphaericus</i>	Menenjit, bakteriyemi, endokardit
<i>B. subtilis</i>	Bakteriyemi, sepsis, pnömoni, endokardit, ventriküloatrial sant. infeksiyonu, üriner sistem infeksiyonu, otit, besin zehirlenmesi
<i>B. thuringiensis</i>	Yara infeksiyonu, kornea infeksiyon

Bacillus'ların sıcaklık sınırları

Bacillus'ların termofilik, mezofilik, psikrotrofik türleri vardır. Termofilik, mezofilik ve pikrotrofik *Bacillus* türleri doğada çok yaygın olarak toprakta, bitkilerde, su kaynaklarında ve gıdalarda kontaminant bakteriler olarak bulunur. Termofil mikroorganizmaların optimum gelişme sıcaklığı 45-60 C° arasındadır. Termofil mikroorganizmalar çoğunlukla *Bacillus* türleridir ve gıdalara çeşitli kaynaklardan kontamine olurlar. Termofilik *Bacillus* türleri, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. sphaericus*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. termodenitrifikans*, *B. simithii*'dir. Mezofil bakteriler 20-44 C° ler arasında gelişirler. Pekçok mikroorganizmanın en iyi gelişebildiği ısı derecesidir. Mezofilik *Bacillus* türleri *B. pumilis*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. mycoides*'dir. Psikrotroflar optimum sıcaklıkları 7 C° nin üzerinde olmasına karşın 7 C° nin altında da çoğalabilen mikroorganizmalardır. Psikrotrofik *Bacillus* türleri de *B. badius*, *B. circulans*, *B. polymyxa*, *B. sphaericus*'dur [17,41].

Bacillus türlerinin önemli endüstriyel enzimleri

Canlı hücreler tarafından meydana getirilen enzimler endüstriyel olarak, bitkilerden (malt diastazi), hayvanlardan (pankreas enzimi, rennet vb.), mikroorganizmalardan (amilaz, proteaz, selüloz) üretilirler. Bu enzimler ekmekçilik, nişasta, sütçülük, et, şekerçilik, bira, şarap, ispirto, tekstil, dericilik vb. pek çok sektörde kullanılmaktadır [42].

Endüstride kullanılan enzimlerin çoğu hücre tarafından bulundukları ortama salgılanır. Bunlara ekzoenzimler denir. Bu enzimler çöktürme, süzdürme ve santrifüj yoluyla ortamdan ayrılırlar. Hücre içi endoenzimlerin alınması otoliz ile ya da hücrenin parçalanması ile olur.

Üretilen endüstriyel enzimlerin büyük bir bölümünü hücre dışı ve hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Bu enzimler nişasta, protein, pektin ve selüloz gibi doğal polimerleri parçalamaktadır [42].

Endüstriyel amaçlara yönelik enzim çalışmalarında da ekonomik ve teknik nedenlerle genellikle bakteriyel kaynaklı enzimler kullanılmıştır. Bakteriyel kaynaklı enzimlerin üretkenlik kapasiteleri tüm gereksinimleri karşılayacak şekilde genişletilebilmektedir.

Mikroorganizmalardan elde edilen ve endüstriyel olarak kullanılan enzimler: Amilaz, proteaz, pektinaz, lipaz, glikoz oksidaz, selüloz, aminoglukosidaz'larıdır.

Bacillus sp. tarafından üretilen enzimler : Pirofosfataz, selüloz, ferrokhelataz, serin proteaz, alkalın proteaz, nötral proteaz, amilaz, lipaz, esteraz, ksilanaz, pitaz, keratinaz, elastaz, beta-glukanaz, pullulanaz.

Proteazlar

Proteaz bakteri, maya, küf gibi geniş aralıktaki mikroorganizmalar tarafından üretilen en önemli endüstriyel enzimlerden birisidir. Aynı zamanda bitki ile çeşitli hayvan dokularında da bulunur. Proteolitik aktiviteye sahip olan enzimler, özellikle bakterilerde saptanmıştır. Bakteriyel proteaz çoğunlukla ekstraselüler, daha fazla miktarlarda kolaylıkla üretilen, termostabil ve geniş pH aralıklarında aktiftir. Bakteriyel orijinli alkalın proteaz, dünya toplam enzim pazarının yaklaşık %60'ında payı olan en önemli endüstriyel enzimdir [43]. Proteazların, deterjan, gıda, farmasötik, deri, ipek, tani ile ilgili ve X-ray filmlerinde kullanılan gümüşün geri kazanımı gibi endüstrilerin geniş alanlarında farklı uygulamaları vardır [44,45]. Proteazların başlıca uygulamaları deterjan endüstrisinde dir. Çünkü çamaşır deterjanlarının pH'ı genellikle 9,0-12,0 aralığındadır. Alkalın proteazlar deterjanlarda proteinlerin çözülmesini kolaylaştırmak amacıyla temizleme katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [46,47].

Çalışmamızın konusunu teşkil eden proteolitik enzimler, protein ve peptidlerdeki peptid bağları üzerinde etkili olan proteinaz ve peptidaz enzimleridir. Proteinaz enzimleri, proteinlerin iç peptid bağları üzerinden etki gösterirken, peptidaz

enzimleri, peptidin serbest amino veya serbest karboksil grubu ile sonuçlanan amino asitlerini parçalar. Ekzopeptidazlar, yalnız peptid uçlarından başlayarak parçalanmaları, yani uçtaki aminoasitleri çözmeleri ile karakterize edilirler. Ayrıca peptit zincirine karboksil ucundan etkileyen ekzopeptidazlara “karboksipeptidazlar”, amino ucundan etkileyenlere de “aminopeptidazlar” adı verilir. Birçok ekzopeptidazlar küçük parçalara, yani oligo ve polipeptitleri seçimli olarak etkiler ki bu nedenle kısaca peptidaz olarak da adlandırılırlar. Endopeptidazlar ise proteinleri zincirin ortasındaki belirli noktalardan parçalarlar ve zincir uçlarına atak yapmazlar. Daha çok proteinlere ve büyük polipeptitlere etki ederler ve proteinaz veya proteaz olarak da adlandırılırlar. Buna göre proteolitik enzimler endo ve ekzopeptidazlar olmak üzere iki grup altında toplanırlar. Bunlardan endopeptidazlar proteinaz enzimlerini, ekzopeptidazlar ise peptidaz enzimlerini ifade ederler.

Proteinaz enzimleri, endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin en önemli grubu olup, bu alanda kullanılan enzimlerin %25’ini teşkil etmektedir. Proteinaz enzimleri 2/3 oranında mikrobiyal kaynaklı olup daha çok *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir [48,49].

Gıdalar üzerinde gelişen bazı mikroorganizmalar proteolitik enzimleri ile proteinleri hidrolize ederek tat ve koku bileşenleri üzerinde olumsuz etkiye neden olurlar [49].

Proteolitik bakteriler hücre dışına salgılanan ekstrasellüler proteaz enzimi üretirler. Bakteri proteazları genellikle hücre içindedir. Fakat sınırlı sayıda bakteri ekstrasellüler proteaz enzimine sahiptirler. Proteolitik bakteriler aerob veya fakültatif anaerob olmalarına ve spor oluşturup oluşturmamalarına göre iki gruba ayrılabilirler. *B. cereus* aerobik, spor oluşturan proteolitik bakteridir. *P. fluorescens* sporsuz, aerob veya fakültatif anaerob, *C. sporogenes* spor formu ve anaerobik bir bakteridir. *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Proteus* cinsinin pek çok türü proteolitik aktiviteye sahiptir [50].

Keay ve arkadaşları 1972 yılında, mikrobiyal proteinazların izolasyon ve üretimleri üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, mikrobiyal proteinazların değişik pH

değerlerinde proteinaz aktivitelerindeki kuvvetliliğe göre asit, nötral ve alkalın proteinazlar diye 3 gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Bunlar sırasıyla;

Asit proteinazlar: esas olarak fungal orjinli olup ve pH değerleri 2-5 arasında maksimum aktivite gösterirler. Asidik proteinazlar, 35.000 civarında moleküler ağırlığa sahiptirler. Asit proteinazlar, pepsin ve renin gibi hayvansal enzimlerle benzerlik göstermektedirler. Asit proteinazlar iki alt gruba ayrılmaktadırlar;

a) Renin benzeri asit proteinazlar

b) Pepsin benzeri asit proteinazlar

Asit proteinazların esas kullanım alanları peynir yapımı ve gıda endüstrisidir. Renin benzeri enzimler daha çok sütü pıhtılaştırma özellikleri ile belirgindirler [51].

Nötral proteinazlar: bakterilerin ve fungusların her ikisinde de yaygın olarak bulunmaktadır. 40-45.000 arasında değişen moleküler ağırlıkları vardır. pH: 7-8'de maksimum aktivite gösterirler ve en fazla besin endüstrisinde kullanılırlar [51].

Alkalın proteinazlar: bakteri ve funguslarda oldukça yaygın olup, hayvansal enzimler olan tripsin ve kimotripsin ile benzerlik göstermektedirler. pH 5-9 arasında maksimum aktivite gösterirler. Deterjan yapımında, gıda ve deri endüstrilerinde kullanılmaktadırlar [51].

Bacillus türlerinden elde edilen alkalın proteazı, toplam mikrobiyal enzim satışlarının %35'ini oluşturan deterjan endüstrisine sunulmasıyla keşfedildi [55,56]. *B. brevis*, *Bacillus* sp. SSR1, ve *B. stearothermophilus* gibi çeşitli *Bacillus* türlerinden elde edilen alkalın proteazın çamaşır deterjanı formülasyonunda kullanıldığı ifade edilmektedir [54,55,56,].

En çok çalışılan alkalın proteinazlar, çeşitli *Bacillus* türleri tarafından üretilen Subtilisin Carlsberg ve Subtilisin Novo'dur. *B. licheniformis* tarafından üretilen Subtilisin Carlsberg ve *B. amyloliquefaciens* tarafından üretilen Subtilisin Novo

deterjan formülasyonlarında seçilen enzimlerdir. Her iki subtilisinin moleküler ağırlığı 27,5 kDa'dur, fakat 58 aminoasit birbirinden farklıdır. Bu enzimler 8.0-10.0 pH değerlerinde maksimum aktivite göstermektedir [51].

İnal ve arkadaşları 1990 yılında yapmış oldukları çalışmada proteinaz enzimlerini, asit proteinazlar, serin proteinazlar, sülfidril proteinazlar ve metal içeren proteinazlar olarak 4 grupta toplamışlardır.

Asit proteinazlar, optimum pH değerleri düşük olan enzimler grubudur. Pepsin, renin, mikrobiyal ve fungal proteinazların büyük bir kısmı bu gruptadır. Bakteri ve fungusların ürettiği asit proteazların en önemlileri pepsin ve renindir. Her ikisi de buzağların midesinden elde edilen enzimler olup peynirlerin yapım ve olgunlaşma işlemlerinde önemli rol oynarlar. Renin, dana midесinin bir ekstraktıdır ve peynir yapımında koagüle edici ajan yerine renin ve pepsin karışımı veya mikrobiyal proteinazlar kullanılmaktadır. Renin'in optimum pH'sı 3,5 olmakla beraber pH 5'te en kararlı yapıdadır. Buzağlar biraz daha büyüdüklerinde ve sütün yanında diğer besinleri de yemeye başladıklarında mideleri renin yerine pepsin üretmeye başlar. Pepsin'in optimum pH'sı 2'dir ve enzim pH 2-5 aralığında sabittir. Bakteriler ve fungusların ürettiği asit proteinazlar, peynir yapımında reninin kullanılmalarının yanısıra, mavi peynirlerin olgunlaşma işlemlerinde de önemli rol oynarlar [57].

Serin proteinazlar kimotripsin, tripsin, elastaz, trombin ve subtilisin'i kapsar. Ham endopeptidazlar ve ince bağırsakta etki gösteren pankreatik enzimlerdir. Zimogen formda üretilir ve proteoliz ile aktif forma dönüşürler [57].

S-H Proteinazların çoğu bitkisel kaynaklıdır ve gıda sanayiinde yaygın olarak kullanılırlar. Papain, fisin ve bromelin gibi çoğu önemli enzimler bu gruptadır [57].

Metal içeren proteinazlar aktiviteleri için bir metale gereksinim duyarlar ve metal kompleksleri tarafından inhibe edilirler [57].

Protein molekülleri, çok sayıda aminoasitin peptid bağlarıyla birleşmesi sonucu meydana gelen polimerlerdir. Bu birleşmede bir aminoasitin karboksil grubu ile diğer aminoasitin amino grubu birleşerek peptid bağı oluşturur. 20 aminoasit bu şekilde bağlanarak birbirinden farklı bileşimde ve molekül ağırlıkta uzun zincirli protein molekülünü meydana getirir. Bu nedenle çeşitli kaynaklardan saflaştırılan proteaz enzimlerinin farklı sıcaklık ve pH'daki konsantrasyonları değişkenlik göstermektedir. Bu konuda yapılan bir çalışmaya göre; *B. subtilis* proteazındaki toplam aminoasit sayısı 274 ve molekül ağırlığı 27 600 dalton olarak bulunurken; *B. amyloliquefaciens* proteazındaki toplam aminoasit sayısı 416, molekül ağırlığı 44 000 dalton olarak tespit edilmiştir [58].

Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin üretiminde üretim ortamının yapısı ve üretim koşulları enzim sentezini etkilemektedir.

Bacillus türleri tarafından üretilen proteaz enzimi bakterinin çeşitli hayat dönemlerine göre değişik konsantrasyonlarda ortama sentezlenir. Bunun yanında pH'ın, sıcaklığın, çeşitli organik ve inorganik maddelerin proteaz üretimi üzerine artırıcı veya azaltıcı etkileri vardır.

Godfery and Reichelt (1983) yaptıkları araştırmada *B. subtilis*'den elde edilen proteaz enziminin 55 °C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği, bu değer üstündeki sıcaklıklarda aktivitenin hızla düştüğünü belirlemişlerdir. *B. licheniformis*'den elde edilen enzimin ise en yüksek aktiviteyi 65 °C'de gösterdiğini tespit etmişlerdir [59].

Bacillus'ların bazı türleri güçlü proteolitik özellik gösterir, buna karşın bazı türleri ya zayıf proteolitik özellik gösterir veya hiç göstermez. Aktif proteolitik türler genellikle ekşitilmeden pıhtılaştırılan süt ürünlerinde kullanılır. *B. cereus* bu özelliği gösteren bir türdür [60].

B. subtilis, *B. mesentericus* ve *B. stearothermophilus* ise bakteriyel proteinaz enzimi üretiminde kullanılmaktadır. Bu enzim et ve balık etlerinin tenderize edilmesinde (yumuşatılması), şarap ve bira endüstrisinde protein bulanıklığının alınmasında

stabilize edici olarak kullanılmakta olup, miso ve soysos üretiminde starter kültür olarak da yararlanılmakta olduğu bildirilmektedir [61].

Bacillus türlerinin önemli bir enzimi olan proteinaz enziminin bakterinin çeşitli hayat dönemlerine göre değişik konsantrasyonlarda ortamda sentezlendiği belirlenmiştir [58,62,63,64,65]. Proteinaz enziminin oluşumu ve sentezlenmesi özellikle üç önemli dönemde artış göstermektedir.

- 1) Germinasyonun başladığı dönem
- 2) Sporlanmanın başladığı dönem
- 3) Sporlanan hücrede lizisin başladığı dönem

Proteinaz enziminin sporlanma sırasında göstermiş olduğu artış, hücre proteinlerinin yıkılarak spor proteinlerinin yapımında kullanılmasıyla ilgilidir. Proteinaz enzimi, sporlanmış hücrenin litik aktivite ile parçalanarak sporların serbest hale geçmesini ve spor hücresinin germinasyonu sırasında spor korteksinin yıkılmasını sağlamaktadır [66,67].

Araştırmacılar, sporlanmaya başlamış bir hücreden proteinaz enziminin sentez edilip ortama salınacağını kabul etmişlerdir. Rappaport ve arkadaşları 1965 yılındaki çalışmalarında hücre ve spor enzimi ile proteinini karşılaştırarak, sporlanma sırasında bazı proteinlerin parçalanmaya uğrayabileceği düşüncesinden hareket ederek bu dönemde proteinaz enzim yoğunluğunun arttığını saptamışlardır.

Bacillus türlerinin proteinaz enzim üretimi genellikle üremenin sabit geç logaritmik fazında meydana gelmektedir.

Keay ve arkadaşları 1972 yılında, *B. megaterium* MA 11, *B. licheniformis* 12, *B. cereus* 13 ve *B. thermoproteoliticus* 14'un proteinaz enzim üretiminin sporulasyonla birlikte logaritmik üreme fazının son döneminde meydana geldiğini bulmuşlardır. *B. megaterium* MA'nın nötral proteinazı (megateriopeptidaz) saflaştırılarak karakterize

edilmiş ve çinko içeren nötral proteaz varlığı belirlenmiştir. Enzim üretimindeki artışın nutrient konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı olduğu bulunmuştur (en az *B. subtilis*'te görüldü). Glukozun proteinaz enzim üretimi üzerine etkisine bakıldığı zaman sıklıkla fakat yavaş bir düşüş gösterdiği ve enzim üretimini baskıladığı gözlenmiştir [51].

B. megaterium ATTC 14581, *B. cereus* NCTT 945, *B. polymxa* ATTC 842, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080, *Aeromonas proteolytica* ATTC 15338 ve *B. subtilis* SP 491 suşlarının nötral proteinaz ürettikleri bulunmuştur. Nötral proteinazlara ilave olarak *B. subtilis* SP 491 suşunun alkalın proteinaz enzimini de ürettikleri bulunmuştur [51].

Proteolitik enzimler, *Bacillus* türleri tarafından üretilen çok önemli ve yaygın bir enzim grubudur. Alkalın yapılarından dolayı tüm mikrobiyal enzimlerin %35 kadarını kapsamakta olup, gıda ve diğer endüstrilerinde yaygın kullanım alanlarına sahiptirler. Proteolitik enzimler gıda sanayiinde büyük önem taşırlar ve besin işleme aşamalarında çok fazla kullanım alanı bulurlar [57, 68].

Proteinaz enzimi üretiminde kullanılan uygun besiyerleri pH'sının 7,0 olduğu gözlemlenmiştir. Çünkü *Bacillus* türleri en iyi üremeyi nötral pH'da gerçekleştirmektedir. Buna bağlı olarak proteinaz enzim sentezinin de bu pH aralığında en yüksek değerine ulaştığı gözlenmiştir [64].

Farklı kaynaklardan saflaştırılan proteinaz enzimlerinin sıcaklık dayanıklılıkları değişkenlik göstermektedir. *B. subtilis*'den elde edilen proteinaz enziminin 55 °C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği, bu değerin üstündeki sıcaklıklarda aktivitenin hızla düştüğü, *B. licheniformis*'den elde edilen enzimin ise en yüksek aktiviteyi 65 °C'de gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [59,68].

Lipazlar

Lipaz enzimleri esteraz enzimlerinin bir sınıfıdır. Lipoliz, yağın lipaz enzimleri ile gliserin ve serbest yağ asitlerine parçalanma olayıdır. Bu olay sonucunda düşük moleküllü yağ asitlerinin serbest hale geçmesiyle acılaşıma diye nitelendirilen aroma bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Lipolitik aroma, eriyen uçucu yağ asitleri oluşturur.

Lipolitik enzimler son zamanlarda biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı dikkat çekmektedirler. Biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalistlerin en önemli grubunu oluşturur.

Biyoteknolojik uygulamalar biyopolimer, biyodizel, farmasötik, kimyasallar ve tatlandırıcı bileşiklerin sentezlenmesinde lipazlar başarıyla kullanılmaktadır. Kimyasal işlemlerle yağlardan üretilen endüstriyel önemi olan bazı kimyasallar, lipazlar ile ılımlı şartlar altında daha hızlı ve daha kararlı bir şekilde üretilebilir [69].

Lipazlar, bakteriyal, fungal, bitki ve hayvanlardan elde edilir. Çok sayıda bakteri, maya ve küf türü lipaz üretir. Bakteri lipazları genellikle bitki ve hayvan lipazlarından daha karardır. Organik çözücülerde aktif kalır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen lipazların, elde edildiği kaynağa göre yağ asidi belirliliği, termostabilitesi, optimum pH vb. çok sayıda özellikleri vardır. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen lipazlar, uygulama özelliklerinin çok yönlü olması, toplu üretiminin kolay olması, düşük maliyetle üretildikleri ve yüksek kararlılık gösterdikleri için biyoteknolojik uygulamalarda oldukça avantajlıdır. Mikrobiyal lipazların çoğu optimal olarak pH 4-9 aralığında ve 45 °C dolayında etki gösterirler [70].

Ekstraselüler mikrobiyal lipazlar spesifitelerine göre 3 gruba ayrılırlar:

1. Nonspesifik: Spesifik olmayan lipazlardır. Bu grup lipazlar trigliseritlerin parçalanarak serbest yağ asitleri ve gliserol, ayrıca ara ürün olarak digliserit ve monogliserit oluşturulmasında kullanılır. Bu tip enzimlere örnek olarak *Candida*

cylindraca, *Corynebacterium acres* ve *Staphylococcus aureus*'dan elde edilen lipazları örnek verebiliriz.

2. 1,3 Spesifik Lipazlar: Lipazların bu grubu gliseritlerin 1 ve 3 pozisyonlarından serbest yağ asitlerinin ayrılması reaksiyonunu katalize ederler. Hidrolize olan trigliserit molekülü serbest yağ asitleri, 1,2 digliseritler ve 2 monogliserit verir. Bu tür lipazlar *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* ve *Rhizopus* türlerinden izole edilebilirler.

3. Gliserit molekülünden yalnız bir tek çeşit yağ asitinin spesifik ayrılma reaksiyonunu katalizleyen lipazlar: Bu tür lipazlar *Geotrichum candidum*'dan üretilirler.

Bacillus subtilis, *B. thermoleovorans*, *B. thermocatenulatus*, *B. coagulans* lipaz üreten bazı *Bacillus* türleridir.

Lipaz enzimi genellikle süt ürünlerinde ve gıda endüstrisinde süt yağlarının hidrolizi için kullanılır. Lipazın etkinliği süt yağlarını parçalayıp yağ asitlerini serbest hale geçirerek pek çok süt ürününe tipik lezzet ve kokuyu kazandırmaktadır.

Bazı peynirlerin olgunlaştırılmaları sırasında istenilen lezzetin meydana gelmesi lipoliz ve proteoliz olaylarının bir sonucudur. Enzimin orjini, pıhtılaşmayı sağlayan maya, starter veya starter olmayan bakteriler olabilir. Süt kaynağının yapısında bulunan lipaz, peynirin lezzeti üzerinde etkili olan yağ asitlerinin serbest hale geçmesini sağlar.

Lipaz üreten mikroorganizmalar, lipaz enzimleri için alternatif kaynaklardır. Bugün yaygın olarak peynir üretiminde lezzet gelişimini ve peynirin hızlı olgunlaşmasını sağlamak amacı ile eksojen lipazlar kullanılmaktadır.

Gıdaların çoğu hidrolize olmaya uygun ve önemli miktarda yağ içerir. Yağların hidrolizi sonucunda yağ asitleri serbest hale geçerek istenmeyen tat ve aroma

değişiklikleri meydana getirirler. Lipolitik değişiklikler gıdalarda bazen istenmeyen durumlar meydana getirir. Bakteri, maya ve küfler gıdalara kontamine olduklarında ürettikleri lipolitik enzimler ile bozulmalara neden olurlar [71].

Bakterilerin lipolitik ve proteolitik aktiviteleri gıdaların bozulmasında en büyük sebeplerden biridir. Gıdaların bozulmalarında endojen lipazların etkileri çeşitli araştırmacıların konularını teşkil etmiştir. Lipaz enzimleri yağları çok düşük sıcaklıklarda hidroliz edebildikleri gibi pastörizasyon ısısında da aktivitelerini sürdürebilmektedirler. Bu durum yağ oranı yüksek ve ısı işlemi görmüş yağların bozulmalarındaki temel problemi oluşturur [52,72,73,74].

Singh et al., (1976) yaptıkları bir araştırmada *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* ve *B. subtilis* lipazlarının -1 ve -180 °C'ler arasında aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir [75].

Kalogridou (1984) araştırmasında *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* ve *Flavobacterium* tarafından üretilen lipaz enzimine çeşitli zaman aralıklarında değişik ısı uygulamıştır. Buna göre 63 °C'de 30 dakikada %14,8-56,2, 72 °C'de 17 dakikada %1,5-41,3 oranında enzim aktivitesinde azalma olduğunu belirlemişlerdir [76].

Yapılan araştırmalar sıcaklığın yanında bazı metal iyonları ile kimyasal maddelerin lipaz enzimi üzerine etkili olduğunu göstermiştir.

Needs et al., (1985) yaptıkları araştırmada Zn^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Co^{+2} gibi ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesini inhibe edici; Ca^{+2} , Mg^{+2} 'nin ise lipaz aktivitesini artırıcı rol oynadığını belirtmişlerdir [77].

Aynı araştırmacılar EDTA ve Ca^{+2} 'nin birlikte lipaz aktivitesini inaktive ettiğini belirlemişlerdir [77].

Dring and Fox (1983) spesifik SH grubu inhibitörlerin iodoasetat, p-hydroxymercuribenzoate'ın lipaz aktivitesini çok yavaş inhibe ettiğini saptamışlardır [78].

2.2. *E. coli* ve Koliform Mikroorganizmaların Genel Özellikleri

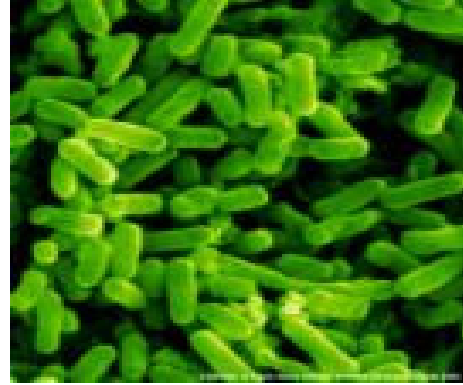
E. coli ilk kez 1881 yılında Alman bilim adamı Theodore Escherich tarafından bir çocuğun dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli commune* olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları bu bakteriye *Escherichia coli* adı verilmiştir. 1950'li yıllardan beri sıcak kanlı hayvanların normal bağırsak florasında yer alan bir bakteri olarak kabul edilmesinden dolayı fekal kontaminasyonun göstergesi olarak değerlendirilmektedir [79,80].

E. coli'nin optimum gelişme sıcaklığı 37 C°, optimum üreme pH'sı 7,2'dir. 44,5 C° de laktozdan gaz oluşturur. Glikozu asit oluşturarak katabolize eder. Laktoz, indol, metil red ve mannitol pozitif olup hareketlidir. Voges Proskauer (VP), sitrat, malonat, adenitol üre, inositol, jelatin, hidrojen sülfür, KCN testi negatiftir. Nitratı nitrite indirger, sakkaroz, salisin ve dulcidol testleri değişkendir. Ortho Nitrofenol P-D Galactopronosid (ONPG) pozitif sonuç verir. Bazı suşları hemolitiktir, suşların çoğu lizin dekarboksilaz enzimi üretir. Laktozu geç kullanan ya da kullanmayan, hareketsiz veya indol negatif suşları vardır. Laktozu 24 saatten geç fermente eden suşlarına parakoli-koliform denir [81].

Enterobacteriaceae familyasının koliform grubu içinde yer alan *E. coli* en yaygın olarak kullanılan indikatör bakteridir. Çünkü; koliform grubu içindeki bakterilerden sadece *E. coli* zorunlu bir intestinal parazittir, doğada serbest yaşayamaz, grubun diğer üyeleri doğal olarak toprakta bulunabilir. İnsanların taze gaytalarında 10⁸ adet gibi yüksek bir oranda bulunması nedeniyle lağım sularının çok seyreltik olarak bulaştığı ortamlarda dahi belirlenebilmektedir. Bu sayede gıdalarda, içme ve kullanma sularında, deniz ve göllerde *E. coli* bulunması orada doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulunduğunun anlaşılmasını sağlamaktadır.



Resim 2.11. *E. coli*'nin morfolojisi [83]



Resim 2.12. *E. coli*'nin mikroskoptaki görünümü [83]

E. coli'nin patojenitesi

E. coli normal bağırsak florasının bir parçası olmasına rağmen; yeni doğan bebeklerde menenjitin, kadınlarda sistit ve nefritin, diareal hastalıkların ciddi belirgin formları ile dizanteriden sorumlu, tüm dünyadaki insanları etkileyen en yaygın gram negatif patojendir. Bu gibi hastalıklara sebep olan *E. coli* suşları bir ya da birden fazla virülans faktörlerine sahiptir. Virülans faktörleri aşağıdaki gibi karakterize edilebilir:

- Spesifik memeli hücrelerine yapışma kapasitesi.
- Bağırsak epitel hücrelerinin içinde intraselüler büyüme ve yayılma.
- Sıvı kaybına yol açan diareyle sonuçlanan, bir ya da birden çok enterotoksin salgılama.
- *E. coli*'nin sebep olduğu menenjit ve sepsisemiden sorumlu antifagositik kapsüle sahip olma [82].

Dünyada su kaybı yüzünden yılda yaklaşık 5 milyon ishal ölümlerinin meydana geldiği hesaplanmıştır. Büyük kısmı yenidoğan ve küçük çocuklarda olmakla beraber büyük bir kısmı enteropatojenik *E. coli* kaynaklıdır. Yetişkinlerdeki hastalık turist ishali olarak bilinmektedir. Günde birçok kez dışkılama ile hafif hastalıktan ciddi ve ölümcül kolera benzeri hastalık gibi çeşitli olabilir. Hayatı tehdit edici *E. coli*

infeksiyonları tüm dünyada meydana gelmekte, en yaygın olarak gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir [82].

İshalden sorumlu olan virülans faktörleri genellikle plazmidde kodlanır. Transdüksiyonla bir zincirden diğerine uzayarak ya da rekombinasyonla kodlanabilir. Sonuçta virülans faktörlerinin çeşitli kombinasyonlarının meydana geldiğini görürüz. Böylece diareye sebep olan *E. coli* suşları hastalık üretme mekanizmasına göre sınıflandırılabilir. Bunlar dört grupta incelenmektedir. Son yıllarda bu ayrımına Enteroaggregatif (EAggEC) ve fakültatif enteropatojenik *E. coli*'de eklenmiştir [82,83,84].

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC): Enterotoksin üreten *E. coli* enterotoksijenik *E. coli* olarak tanımlanmaktadır ve LT denilen heat-labil toksin ile ST denilen heat-stable toksinin birini ya da her ikisini üretir. Hem LT, hem de ST üretebilme genetik kabiliyeti DNA'daki değiştirilebilir plazmitler sayesinde gerçekleşir (ent plazmitleri). Heat-labil toksin; Kolera toksini olarak da tanımlanır. 65 °C'de 30 dakikada parçalanır, büyük oranda temizlenir. Kolera toksini gibi membrana bağlı adenilat siklazı stümile ederek diareye sebep olur. Heat-stable toksin; 100 °C'de 30 dakikada parçalanmaz, LT gibi antiabsorbatif etki yaratır.

ETEC seyahat diaresinin en önemli nedeni olarak görülmekte ve bu tür vakalardan %60-70 ETEC sorumlu tutulmaktadır. Etkenin en çok fekal kontaminasyonlu su ve bu sularla temas eden çiğ sebzelerden bulaştığı bildirilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde çocuk ve bebeklerdeki diarenin önemli bir nedenidir. İnsanlarda sebep olduğu enfeksiyon koleraya benzemektedir. Belirtiler arasında sulu diare, dehidrasyon, bazen kusma görülür [80,82,85].

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC): EHEC ilk kez 1982 yılında şiddetli karın ağrısı ve çok kanlı diareyle karakterize edilen hemolitik kolitin etiyolojik ajanı olarak tanımlanmıştır. Bu organizmaların aynı zamanda Hemolitik Üremik Sendroma (HUS)'da yol açtığı bilinmektedir. Bu sendromun hemolitik anemi, trombositopeni

ve akut renal hasar olduğu bilinmektedir. HUS en çok çocuklarda meydana gelmektedir.

EHEC *E. coli* grupları arasında en patojen olanıdır. En yaygın EHEC serotip O1157:H7' e ait olarak belirlense de başka EHEC serotipleri belirlenmiştir. İnvasiv değildir, fakat fimbrial antijenle bağırsak epiteline yapışır. EHEC bir ya da iki adet antijenik olarak belli toksinler üretir. Toksinlerin biyolojik kimliği ve antijenik yapısı *Shigella dysenteria*'nın toksinine benzerliğinden olayı “Shigella benzeri toksin” denir. Vero hücrelerini öldürme yeteneklerinden dolayı Verotoksin olarak da adlandırılırlar. Hemorajik kolit salgınları kontamine gıdalardan kaynaklandığı kadar bakım evlerinde ve günlük bakım merkezlerinde kişiden kişiye geçebilmektedir. Kontamine hamburger eti bu tip gıda kaynaklı hastalıkların bir kaynağıdır. Sığırlar EHEC'in temel rezervuarı olabileceği belirtilmiştir. *E. coli* O1157:H7'nin -20 °C'de bifttek yüzeyinde 9 aydan fazla yaşayabildiği belirtilmiştir [82].

Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC): EIEC'in en büyük virölans faktörü epitel hücreleri istila etmesidir. Hücreler içinde çoğalmakta ve yanındaki hücrelere yayılmakta, bu şekilde kolon ülserasyonuna ve kanlı diareye neden olmaktadır. EIEC'in kolon içine girme yeteneğinin plazmite bağlı olduğu ve bu plazmitlerin birçok membran proteinlerini kodladığı bildirilmiştir [80,85,86].

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC): EPEC diare oluşma mekanizması zayıf anlaşılmış organizmaların karışımından oluşur. Klasik EPEC bir düzine ya da daha fazla serotipi içerir. Bu serotiplerin hepsi EPEC adezin faktör (EAF) denilen bir adezini kodlayan 55-56 Mdalton'luk plazmidi taşımasıyla karakterize edilmektedir. EAF ince bağırsak enterositlerine bakterinin sıkıca yapışmasını sağlar. Bu olay normal mikrovillüs yapısının yıkılmasıyla sonuçlanır. Dolayısıyla epitel hücre membranında modifikasyona, ardından da hastalığın patogenezinin anahtarı gibi görülen sindirim ve adsorbsiyonun fizyolojisini etkileyen inflamasyona yol açar [82].

Bu bakteri grubu 1940 ve 1950'li yıllarda Amerika'da ciddi sorunlara yol açmış, bebeklerde neden olduğu hastalıklarla ölüm oranı %50'lere ulaşmıştır. Günümüzde

ise iyi hijyenik standartlara sahip olan ülkelerde seyrek olmakla birlikte, gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda görülen diarenin en önemli nedenlerinden biridir. Hastane personeli ve yeni doğanlarda görülme olasılığı yüksektir. Yetişkinleri etkileyen su ve gıda kaynaklı salgınlar söz konusudur. Bu salgınlarda klorlanmamış kuyu suyu, önceden pişirilmiş soğuk domuz eti ve etli börek gibi gıdaların kaynak teşkil ettiği belirtilmektedir [80,85,87].

Enteroaggregatif *E.coli* (EAggEC): Hep-2 hücrelerine belirgin bir şekilde yapışmaları ile karakterize edilirler. Çocuklardaki inatçı ishalin sebebi olarak belirlenmiştir [87].

Gültekin ve ark. Sivas yöresinde 231 ishalleri vakada tespit ettikleri ishal etkeni mikroorganizmalar arasında %4,3 EPEC, % 3 ETEC, %1,3 EIEC bakterilerini ürettiklerini bildirmişlerdir [88].

İstanbul'da yapılan bir çalışmada, 1890 ishalleri vakanın %30,8'inden patojen bakteri izole edilmiş, izole edilen patojenlerin 62'sinin (%5,35) EPEC olduğu bildirilmiştir [89].

Amerika'da ishal etkenleri arasında *E. coli* O1157:H7 %1-3, ETEC %1-3 oranlarında gözlenmektedir [90].

Arjantin'de yapılan bir araştırmada, enteropatojenik *E. coli* (EPEC) %26,1, enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)'yi %9,7 oranında izole ettikleri bildirilmiştir [91].

E. coli dışındaki koliform grup mikroorganizmalar

Koliform grubu içine dahil edilen mikroorganizmaların ortak fizyolojik özellikleri vardır. Bu organizmalar; aerop ve fakültatif aerop, gram negatif, spor oluşturmayan, 35 °C'de 48 saat içinde laktozdan gaz oluşturan, genellikle peritrik flagella sayesinde hareketlidirler. Glikozu gaz oluşturarak aerobik ya da anerobik olarak parçalarlar. Oksidaz negatif, katalaz pozitiflerdir. Karakteristik olarak Eozin Metilen Blue

Agar'da ve Endo Agar'da 35-37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda, sarı- yeşil metalik parıltılı, koyu koloniler oluşturarak gelişirler [92,93].

Koliform grup bakterilere doğada ve gıdalarda sıklıkla rastlanır. Bir çok taze sebze doğal olarak 10^6 - 10^7 kob/g düzeyinde koliform grup bakteriye rastlanırken, dışkı aracılığı ile özellikle başta süt ve süt ürünleri olmak üzere hayvansal gıdalarda, lağım suyu ile sulanmış sebzelerde yaygın bir şekilde bulunurlar.

Doğaya dışkı yoluyla dahil olan koliformlar uygun olmayan koşullar nedeniyle genellikle ölürlür. Suda birkaç saatten birkaç güne kadar canlı kalabilirken kuruluğa dayanıksızdırlar. Güneş, çevredeki diğer mikroorganizmalar, protozoa, endüstriyel atıklar gibi etkenler koliformların hayatta kalmalarını engellemektedir [79].

Fekal ya da fekal olmayan kaynaklardan gıdalara bulaşabilen, gıda mikrobiyolojisi bakımından önemli, *E. coli* dahil 5 koliform türü bulunmaktadır. Bu türler; *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloaca*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Citrobacter freundii*'dir. Bu türlere ek olarak koliformlara dahil edilen diğer türler ise; *Citrobacter diversus*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxytoc*, *Serratia liquefaciens*, *S. fanticola*, *S. rubidaea*, *S. odorifera*, *Hafnia alvei* ve *Rahnella aquatilis*'tir [92,94].

Klebsiella pneumoniae: Bu tür, canlıların boşaltım ve solunum borusundan %5 oranında izole edilebilir. Organizma hareketsizdir ve kapsülünün antijenik yapısına göre en az 77 alt gruba ayrılabilir. *Klebsiella pneumoniae* (tip 1 ve2) ciddi ve yıkıcı bakteriyel pnemoniye sebep olabilir. Ancak *Klebsiella* genellikle, daha sıklıkla hastane kaynaklı üriner yol enfeksiyonları, yanık yarası enfeksiyonları, ya da diğer solunum yolları enfeksiyonlarında fırsatçıdır. Nozokominal enfeksiyonlarına en sık yol açan Gram negatif patojen ve Gram negatif organizmalar içinde bakteriyemiye sebep olan *E. coli*'den sonra ikinci en sık patojen olarak sayılır.

Klebsiella'nın bazı suşlarının ishal epidemileri rapor edilmiştir. Bu oldukça normaldir, çünkü *E. coli*'nin Heat Labil ve Heat Stabil enterotoksinlerini kodlayan

plazmitleri edinmiştir. Nişastayı dört günde parçalayarak gaz oluşturmaya bu bakteriyi diğer bağırsak bakterilerinden ayıran en önemli özelliktir [95,96].

Enterobacter: *Enterobacter* cinsi, *Klebsiella*'dan hareketli olmasıyla ayrılabilir. Boşaltım kanallarının normal florasını oluştururlar. Su, lağım suyu, toprak, günlük ürünlerde rastlanır. *Enterobacter*'in hastane kaynaklı üriner yol enfeksiyonlarında ender olarak primer patojen olması beklenir [82].

Serratia: *Serratia* cinsinden geçmişte tamamen zararsız olarak söz edilirdi, ancak şimdilerde bu organizmanın yeni doğanlarda, zayıflamış ya da immün sistemi baskılayıcı ilaç kullanan hastalarda fırsatçı patojen olduğu bilinmektedir [82].

Citrobacter: Genellikle insan dışkısında bulunurlar. Diğer koliformların yaptığı enfeksiyonlarla *Salmonella*'nıninkine benzer bağırsak enfeksiyonlarına sebep olurlar. *Citrobacter*'ler et ve et ürünlerinden sıklıkla izole edilirler [95,97].

Hafnia: Bazı taksonomistler *Hafnia* cinsinin *Enterobacter*'in türlerini içerdiğine inanırlar. Bunun sebebi özellikle 197 serotipinin hastalık potansiyeli ve korunmasının *Enterobacter* cinsindekilerle karakterize olmasıdır [82].

Koliform grup mikroorganizmalar insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak sisteminde doğal olarak bulundukları için fekal kontaminasyonun en iyi indikatörü olarak değerlendirilmektedir. Gıdalarda rastlanan koliform mikroorganizmalar, insan ve hayvan kaynaklı fekal bulaşma düzeyini, yetersiz veya yanlış pastörizasyon tekniğini, pişirme veya sonrası kontaminasyonu ve kötü depolama koşullarını göstermektedir [98].

Fekal koliformların var oldukları yerlerde aynı zamanda enterik patojenlerin de bulunması, fekal koliformlar ile kontamine su ve gıdaların; tifo, dizanteri, hepatit ve gastroenterit gibi etmenleri de çok yüksek bir olasılıkla bulundurduğunu akla getirmektedir. Ancak bazı koliform bakterilerin sadece fekal orijinli olmadığı gözardı edilmemelidir. *E. coli* tipik dışkı orijinli bir bakteri iken, *Enterobacter aerogenes*,

Citrobacter freundii ve *Klebsiella pneumoniae* doğada hem bitkilerde, hem de hayvanların bağırsak sistemlerinde bulunabilir [99].

Eijkman, 1904 yılında bağırsak kökenli koliformların 46 °C’de Glikoz broth içinde gaz oluşturabildiklerini, bağırsak kökenli olmayan koliformların ise gaz oluşturmadaıkları sonucunu bildirmiştir. Daha sonraki yıllarda 44,5 °C’de laktozdan gaz ve asit oluşturabilen koliformlara fekal koliform adı verilmiştir. Bazı *Citrobacter* ve *Klebsiella* gibi bakteri suşları da fekal koliform tanımına uymaktadır, ancak fekal koliform denildiğinde akla hemen *E. coli* gelmektedir. Günümüzde koliform grup üyelerinin Eijkman testi ile dışkı veya toprak/bitki kökenli olduğu anlaşılabildiği gerekçesiyle su ve gıdalarda belli sayıda koliform bakteri bulunmasına izin verilmekte, ancak fekal koliform ve *E. coli* izin verilmemektedir. Çünkü *E. coli* bulunması orada benzeri bağırsak kökenli *Salmonella* ve *Shigella* gibi primer patojen bakterilerin olabileceğini göstermektedir [93].

Gıdalardan koliform grup mikroorganizmaların ve *E. coli*’nin izolasyonunda kullanılan klasik yöntemler, en muhtemel sayı yöntemleri (EMS), katı besiyeri yöntemi ve membran filtrasyon yöntemidir. Geleneksel kültür yöntemlerinde, Uluslararası Standartlar Enstitüsü (ISO) ile FDA gibi standart analiz kuruluşlarında kullanılan EMS yöntemi ülkemizde de kamu ve özel sektör laboratuvarlarında kullanılmaktadır [100,101].

En muhtemel sayı yöntemleri (EMS)

Materyaldeki canlı hücre sayısının koloni oluşumu ile sayılamayacak kadar az olduğu örneklerde sayım sıvı besiyeri ile yapılır. Bu amaçla en çok kullanılan yöntem En Muhtemel Sayı (EMS; Most Probably Number; MPN) olup gıda sanayiinde pek çok mikroorganizmanın sayımı bu yöntemle yapılır.

EMS tekniği; tüp dilüsyon sayı yönteminin geliştirilmiş şeklidir. Katı besiyerinde bir canlı hücrenin bir koloni oluşturması esassından yola çıkılarak sayım yapılırken EMS yönteminde inokülasyon yapılan tüpe en az bir hücrenin geçmesi esas alınır. EMS

teknğinde sayım sonuçları istatistik olarak hesaplanmış standart çizelgelerden okunur. Katı besiyerinde yapılan sayımlar daha iyi sonuç vermesine karşın kullanılan EMS yönteminin birçok avantajı sözkonusudur. Örneğin bazı mikroorganizmalar katı besiyerinde üretilmeyebilir ya da çok zayıf üreyebilir, bu durumda sıvı besiyeri kullanılan bir sayım tekniği, dolayısıyla EMS kullanılır. Bununla birlikte hasar görmüş hücrelerin sıvı besiyerinde daha rahat gelişebilmeleri teknolojik işlem görmüş gıdalardaki sayım sonuçlarının EMS yönteminde alınan sonuçların katı besiyerinde alınan sonuçlardan farklı olmasına sebep olur. EMS yönteminde elde edilen sonuçlar katı besiyerinde elde edilen sonuçlara göre daha yoğun olmaktadır. Bunun sebebi katı besiyerinde sadece aktif hücreler sayılabilirken, sıvı besiyerinde hasar gören hücreler de sayılabilmektedir. Çünkü hasar gören hücreler de bazı enzimatik faaliyetlerine devam etmekte ve uygun koşullarda kendilerini onararak aktif hücre haline gelebilmektedir. Bu yönüyle düşünüldüğünde EMS tekniği daha doğru sonuç vermektedir. Sayım yapılacak materyalde 1 ml'de 1'den daha az, 1 gramda 10'dan daha az sayıda mikroorganizma varsa katı besiyeri kullanılması sözkonusu olamaz. Bu gibi örneklerin analizinde ya membran filtrasyon yöntemi ya da EMS yöntemi kullanılır. Materyal filtreden geçirilemiyorsa tek pratik yöntem EMS yöntemidir. EMS yöntemi agarlı yöntemle göre daha pratiktir; tüplerin otomatik doldurulduğu sistemler sayesinde günümüzde daha da kolay bir yöntem olmuştur. Ayrıca sıvı besiyerlerinin hazırlandıktan sonra katı besiyerlerine nazaran daha uzun süre tazeliğini koruması da EMS yönteminin avantajlarından birisidir [92].

EMS yöntemi tüp dilüsyon tekniğinin bir modifikasyonudur. Ancak uygulaması konusunda farklı görüşler vardır. Üzerinde en çok konuşulan konu her dilüsyondan kaç tüpe ekim yapılacağıdır. Ekim yapılan tüplerin sayısı arttıkça sayım sonucu daha doğru çıksa da maliyeti de o oranda artacaktır [89]. Her dilüsyondan 3, 5, 10 tüpe ekim yapılan sistemler ve bunların uygulandığında elde edilebilecek sonuçları içeren standart çizelgeler geliştirilmiştir. Bunların yanında ardışık iki dilüsyonun birincisinden 2, ikincisinden 5 tüpe ekim yapılan modeller de bulunmaktadır [102].

EMS yönteminde materyalin standart 1: 9 oranında dilüsyonu yapılır. Dilüsyonlardan uygun sıvı besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra üreme sonuçları kontrol edilerek sayı

hesaplanır. Bir diğ er deyiş ile t p dilüsyon yönteminde her dilüsyon için 1 t p kullanılırken, EMS yönteminde her dilüsyondan 1'den fazla sayıda ekim yapılır. Aynı dilüsyondan yapılan paralel ekim sayısı arttıkça, istatistiki olasılık kurallarına göre daha doğ ru sonuçlar alınır. Aynı dilüsyondan yapılan paralel ekim sayısı sonsuza ulaştığında ise sayım sonucu kesinleşir [92].

Amerikan Mikrobiyoloji Derneği EMS yönteminde her dilüsyondan 10'ar tüpe ekim yapılmasını önermektedir [103].

Koliform / *E. coli* arama tekniği olarak EMS yöntemini kullanan Amerikan Resmi Kimyacılar Birliği (AOAC) ise her dilüsyondan 3'er tüpe ekim yapmaktadır. AOAC'ye göre materyal hazırlanıp dilüsyonları yapıldıktan sonra ardışık üç dilüsyondan 3'er adet Lauril Sülfat Triptoz Broth (LSTB) besiyerine 1'er ml ekim yapılmakta, 35  C'de 48 saat içinde gaz oluşturarak üreme gözlenen tüpler muhtemel koliform olarak değerlendirilmekte, bu tüplerden Brilliant Gren Bile Broth (BGBB) besiyerine ve *E. coli* Broth besiyerine ekim yapılmakta, 35  C'de 48 saat inkübe edilen BGBB tüplerinde gaz oluşturarak üreyen bakteriler koliform grup olarak doğrulanmakta, 44,5  C'de 48 saat inkübe edilen ECB besiyerindeki pozitif sonuçlar ise *E. coli* olarak sayılmakta, bu kültürlerden EMB agar besiyerine sürme yapılarak, ayrıca gram boyama ve IMVIC testleri uygulanarak *E. coli* doğrulanmaktadır [81,100,102].

Aynı  rg t, ardışık üç dilüsyondan 3'er adet LSTB besiyerine inokülasyon yapılıp tüplerin kapalı su banyosunda 44,5  C'de 24 saat inkübe edilmesinin sonunda pozitif sonuç veren tüplerin *E. coli* olarak değerlendirilmesini ve bu kültürlerden EMB agara sürme yapılarak *E. coli* doğrulamasını hızlı *E. coli* tayin yöntemi olarak göstermektedir. Bu  er evede, *E. coli*'nin EMS yöntemiyle sayılmasında en sık kullanılan sıvı besiyerleri LSTB, ECB, Laktoz Broth ve Mac Concey Broth'dur. Bu yöntemlerin tümünde *E. coli* analizi en az 48 saat sürmektedir [79].

1982 yılında Feng ve Hertman *E. coli*'nin sahip olduğu  -D glukuronidaz ( -GUR) enziminin aktivitesine dayanarak hazırlanan kültür ortamı içinde *E. coli*'nin varlığını

hızlı bir şekilde tespit edecek florojenik metodu geliştirdiler. Bu metoda göre; *E. coli*'nin sahip olduğu bu enzim, 4-metil-umbelliferil β -D glukuronid'i (MUG) hidrolize ederek florojen bir bileşik olan 4-metilumbelliferon'u meydana getirir. Kültür ortamı MUG ile desteklenebilir ve inkübasyondan sonra UV lambası broth içinde üreyen kolonilerin meydana getirdiği floresan ışıma tespit edilebilir. MUG inkübasyonu şüpheli *E. coli* sonucu için gerekli olan zamanda kesilmelidir. MUG pozitif kültürler ve *E. coli*'nin diğer metotlarla doğrulanması arasında yüksek bir korelasyon vardır. MUG reaksiyonu düşük bir oranda yanlış sonuç vermektedir. Bu yüzden MUG mevcut sayım ve doğrulama metotları arasında kullanışlı bir araçtır. Aynı araştırmacılar, hasar görmüş *E. coli*'nin LSTB+MUG besiyerinde, Violet Red Bile Agar + MUG besiyerine kıyasla daha iyi sonuç verdiğini, ortamda yüksek sayıda rekabetçi bakteri olmasına karşın az sayıda bulunan *E. coli*'nin bile bu yöntemle belirlenebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmalarından sonra EMS tekniğinde kullanılan besiyerlerine MUG ilave ederek kıyaslamalı pek çok çalışma yapılmıştır. MUG kullanılan besiyerleri ile *E. coli* analizinde yüksek düzeyde tatmin edici sonuçlar alınmıştır. Bu gün AOAC'de dahil olmak üzere pek çok standart analiz kuruluşu tarafından MUG yöntemi benimsenmiştir [104].

Florojenik ve kromojenik β -D glukuronidaz indikatörleri, *Enterobacteriaceae* ile *Vibrionaceae* arasında GUR aktivitesiyle *E. coli*'yi tamamen ayırt edebilmektedir [105].

1993 yılında yapılan bir çalışmada, 10 farklı gıda örneği AOAC tarafından gösterilen EMS tekniğiyle *E. coli* sayım yöntemi ile aynı tekniği LSTB+MUG kullanarak karşılaştırılmış, LSTB besiyerinde %81, LSTB+MUG besiyerinde ise % 91 pozitif sonuç alınmıştır. MUG'un, yöntemin analiz süresini 3 gün kısalttığı, sahte pozitif ve negatif sonuçlara karşın MUG tekniğinin çok daha duyarlı ve çabuk bir yöntem olduğu belirtilmiştir [102].

Ülkemizde 2001 yılında Çakır ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MUG metodu ISO prosedürüyle 500 gıda analiz edilerek kıyaslanmış araştırma sonunda MUG kullanılan EMS yönteminin ISO yöntemine göre daha hızlı, daha ucuz olduğunu,

gıda analiz sonuçları arasında iki yöntemde istatistik olarak fark bulunmadığını, 500 gıda örneğinin 467'sinden *E. coli* izole edildiğini (%93,4), örneklerdeki *E. coli* sayısının 0,18-5,04 log MPN /gr yada ml olarak bulunduğunu bildirmişlerdir [106].

2.3. Kekik (*Satureja wiedemanniana*) Bitkisi Uçucu Yağının Antimikrobiyal Aktivitesi

Yurdumuzda en fazla bilinen ve kullanılan tıbbi ve aromatik bitkiler Labiateae familyasına ait olup dünyanın pek çok yerinde bulunmaktadır. Bunlardan birisi de *Thymus* spp. (kekik)'dir. Labiateae familyası Türkiye'de en yaygın türlere sahip familyalardan birisidir. Bu familyaya ait olan *Satureja* cinsi Türkiye'de 5'i endemik toplam 15 türle temsil edilmektedir [107].

Birçok *Satureja* türü yöresel olarak “kekik”, “sivri kekik”, “kılıç kekik”, “keklik otu”, “catlı” veya “firibu” isimleri ile bilinmektedir. Ayrıca Türkiye'nin değişik bölgelerinde baharat, çay ve şifalı bitki olarak da kullanılmakta olan birçok *Satureja* türünün uçucu yağının kimyasal bileşenleri çalışılmıştır [107,108].

Tıbbi ve aromatik bitkiler baharat olarak kullanımının yanı sıra tıp, eczacılık, kozmetik ve tarım alanında da kullanım alanı bulmaktadır. Şifalı bitki olarak kekik halk arasında kramp çözücü, dezenfekte edici ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadır. Akciğer, bronşlar, mide ve bağırsaklar, kekiğin başlıca kullanım alanlarıdır. Bitkinin önemli etken maddesi olan eterli uçucu yağlar kana karışıp, bronşiyal kasları etkileyerek, krampları çözücü özelliğindedir. Aynı zamanda o bölgelerde bakteri oluşumunu da önler [109].

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması ve doğal kaynaklı ilaçlarda görülmeyen veya az görülen yan etkilerin sentetik ilaçlarda dikkati çekecek kadar çok olması, bilim adamlarını doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya itmiştir. Tarımda, besinlerin korumasında ve tıpta mikroorganizmalara karşı etkili maddelere büyük gereksinim duyulmaktadır. Çeşitli bilim adamları birçok tıbbi bitkiyi

tanımlamış ve bu bitkisel drogların bir çoğunun etkisi bilimsel olarak kanıtlanmıştır [109,110].



Resim 2.13. *Satureja cuneifolia* bitkisi



Resim 2.14. *Satureja hortensis* bitkisi

Kan ve ark. (2005) tarafından Konya bölgesinden toplanan *S. cuneifolia* bitkisinden elde edilen essential yağların kimyasal analizi ve antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Araştırmada test mikroorganizmaları olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 29998 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 kullanılmıştır. %10'luk konsantrasyondaki *S. cuneifolia* uçucu yağının *P. aeruginosa*'da oluşturduğu inhibisyon zon çapı $11 \pm 0,8$ mm, *B. cereus*'da $12 \pm 1,7$ mm, *E. coli*'de $6,3 \pm 2,7$ mm, *S. aureus*'da $7,8 \pm 3,2$ mm, *S. lutea* inhibisyon zon çapı $7,3 \pm 2,8$ mm olarak bulunmuştur [111].

Gören ve ark. tarafından Gebze'de (2003) *Satureja thymbra* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır. Etanolde dilüsyonu yapılan *S. thymbra* ekstraktı test edilen organizmaların üremesini inhibe etmezken, dilüsyonu yapılmamış uçucu yağın test mikroorganizmaları üzerinde

antimikrobiyal aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite *C. albicans* (40mm inhibisyon zon çapı) ve *S. typhimurium* (25mm)'da gözlenmiştir [112].

Azaz ve ark. tarafından (2002) yapılan çalışmada bazı *Satureja* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlar. *S. pilosa* yağı *Candida albicans*'a karşı 31,25 µg/ml minimum inhibitör konsantrasyon değeri göstermiştir. *S. icarica* yağı en çok *Pseudomonas aeruginosa* bakterisini inhibe etmiştir. Test edilen diğer yağlar da bu bakteriye inhibitör aktivite göstermiştir. *S. pilosa* ve *S. icarica* yağının her ikisi de 62,5 µg/ml MIC değeri ile *Enterobacter aerogenes*'i inhibe etmiştir. *S. coerulea* dışında tüm yağlar standart antibiyotik gibi *Salmonella typhimurium*'u inhibe etmiştir [113].

Adıgüzel ve arkadaşları tarafından (2007) Artvin'den toplanan *Satureja hortensis* uçucu yağlarının gıda zehirlenmesine yol açan bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Uçucu yağ *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes* gibi test edilen bakterilerin büyümesini inhibe edememiştir [114].

Biavati ve arkadaşları tarafından (2004) Antalya'dan toplanan *Satureja cuneifolia* ve *Thymbra sintenisii* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. En duyarlı mikroorganizmalar mayalar ve *Bacillus licheniformis*, *Clostridium tyrobutyricum* ve *Bifidobacterium dentum* olarak tespit edilmiştir. Test edilen yağlar *Bacillus*, *Brevibacillus* ve *Lactobacillus* cinslerinin çoğu türüne karşı zayıf aktivite göstermiştir [115].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Örneklerin Toplanması

Araştırmamızda 01.03.2006-28.06.2007 tarihleri arasında toplam 45 adet olmak üzere 15'er adetlik gruplar halinde Ankara ilinde tüketime sunulan kuşbaşı, kıyma ve tavuk eti örneklerinde mezofilik *Bacillus* cinsi bakterilerin varlığı ile koliform grubu mikroorganizma ve *E. coli* sayısı araştırılmıştır.

Çeşitli market ve kasaplardan temin edilen et örnekleri steril poşetlere alınarak en kısa süre içerisinde laboratuvara getirilerek analizi yapılmıştır.

Koliform bakteriler ve *E. coli* varlığı en muhtemel sayı yöntemiyle (EMS) kontrol edilmiştir.

Ayrıca *Bacillus* olarak tanımlanan izolatların proteaz ve lipaz enzim aktiviteleri çalışılmıştır.

3.2. *Bacillus* İzolatlarının Tanımlanması ve Tanımlanmada Kullanılan Testler

Mezofilik *Bacillus* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu için öncelikle alınan örneklerinin homojenizasyon ve seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için peptonlu su kullanılmıştır. Analize aldığımız et örneğinden 10 gr tartıp içeriklere göre hazırlanan 90 ml peptonlu su bulunan tüpe aktarılmıştır. Böylece örneğimizin 1:9 oranında homojenizasyonunu, 10^{-1} seyreltmesi yapılmıştır. Daha sonra yine peptonlu su kullanılarak 10^{-2} ve 10^{-3} dilüsyonlar hazırlanmıştır.

Bacillus izolasyonu için Plate Count Agar (PCA) ve Glikoz Agar (GA) besiyerleri kullanılmıştır. 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltilerdeki tüplerden steril bir pipet ile her bir tüpten 0,1 ml alınarak PCA ve GA besiyerlerine aktarıldı. Steril drigalski özesi ile yayma yöntemi kullanılarak örneğin bütün plağa homojen bir şekilde dağılması

sağlanmıştır. Ekim işlemini tamamladıktan sonra plaklar 37 °C’de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda üreme olan plaklardan, kuru beyaz, mukoid ve mat, sarımsı, krem renginde olan şüpheli *Bacillus* kolonileri öze ile alınarak gram boyama yapılmıştır. Daha sonra gram pozitif, sporlu, *Bacillus* kolonileri yatık nutrient agar besiyerine ekilerek stok yapılmıştır. İdentifikasyon için çeşitli biyokimyasal testler yapılmıştır [116].

Gram Boyama ve Mikroskopik inceleme

Saf kültürden preparat hazırlayarak klasik gram boyama metoduna göre boyaması yapılmıştır. Preparatların boyaması yapıldıktan sonra mikroskopun (A-216 Prior, England) immersiyon objektifinde incelenmiştir. Gram pozitif, ince, çubuk şeklinde, spor formunda görünen mikroorganizmalar *Bacillus* olarak değerlendirilmiştir.

Bacillus suşlarının tanımlanması

PCA ve GA besiyerlerinde üreyen *Bacillus*’ların tanımlanmasında çeşitli biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. *Bacillus*’lar üzerinde katalaz testi, hareket (SIM), jelatin hidrolizi, oksidasyon-fermentasyon testi (OF), Triple Sugar İron (TSI), sitrat,üre, indol, Voges Proskauer (VP), %6,5 NaCl’de üreme, nitrat, eskülin testi, nişasta testi, lesitin testleri uygulanmıştır. *Bacillus* suşlarının şeker kullanım testleri yapılmıştır. Bu amaçla karbonhidrat fermentasyon besiyeri (Purple Broth Base-Difco) kullanılmıştır. Kullanılan şekerler glikoz, arabinoz, ksiloz, mannitol, laktoz, sükroz, maltoz ve glikozdan asit üretimi incelenmiştir [17,59,117].

Çizelge 3.1. Çeşitli et örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler [116]

	O-F	Hareket	%6,5 NaCl	Nitrat	Jelatin	Esculin	Katalaz	VP	Nişasta	Lesitin	Şitrat	TSI	Üreaz	İndol	Jelatin 22°C
<i>B. subtilis</i>	F	V	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-/V	V	-	+
<i>B. alcalophilus</i>	F	V	-	-	+	V	+	-	+	-	-	-/v	-	-	-
<i>B. alvei</i>	F	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	v/ +	+	+	+
<i>B. badius</i>	F	V	V	-	V	V	+	-	-	V	-	-/V	-	-	-
<i>B. brevis</i>	OF	+	-	V	+	V	+	-	+	-	V	-/V	V	-	V
<i>B. cereus</i>	F	+	V	V	-	+	+	-	+	-	V	-/V	V	-	+
<i>B. circulans</i>	F	+	V	V	-	+	+	-	+	-	V	-/V	-	-	-
<i>B. coagulans</i>	F	+	-	-	-	-	+	+	+	-	V	-/+	-	-	-
<i>B. firmus</i>	F	+	+	V	+	V	+	-	+	-	-	-/V	-	-	V
<i>B. insolitus</i>	F	V	-	-	-	V	+	-	-	V	-	-/V	-	-	-
<i>B. laterosporus</i>	F	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-/V	-	V	+
<i>B. lentus</i>	F	+	V	V	V	+	+	-	+	-	-	-/+	+	-	-
<i>B. licheniformis</i>	F	V	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-/V	V	-	V
<i>B. macerans</i>	F	V	-	+	+	+	+	-	+	-	V	-/V	V	-	-
<i>B. megaterium</i>	F	V	V	-	+	V	+	-	+	-	+	-/-	V	-	+
<i>B. mycoides</i>	F	-	V	+	+	V	+	+	+	V	V	-/V	V	-	+
<i>B. pantothenicus</i>	F	V	+	V	+	V	+	-	+	-	-	-/V	-	-	-
<i>B. polymyxa</i>	F	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-/V	-	-	-
<i>B. pumilis</i>	F	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-/V	-	-	+
<i>B. sphaericus</i>	OF	+	V	-	-	-	+	-	-	-	V	-/V	V	-	-
<i>B. stearothermophilus</i>	F	+	-	+	+	+	V	-	+	V	V	-/+	-	-	-

F : Fermentatif, OF : Oksidatif/ Fermentatif, V : Değişken

Çizelge 3.2. Çeşitli et örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanmasında kullanılan karbonhidrat fermentasyon testleri [116]

	Glikozdan gaz	Glikoz	Arabinoz	Ksiloz	Mannitol	Laktoz	Sukroz	Maltoz
<i>B. subtilis</i>	-	+	+	+	+	-	+	V
<i>B. alcalophilus</i>	-	+	+	+	+	V	V	V
<i>B. alvei</i>	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>B. badius</i>	-	-	-	-	-	V	V	V
<i>B. brevis</i>	-	V	-	-	+	-	V	+
<i>B. cereus</i>	-	+	-	-	-	-	V	+
<i>B. circulans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. coagulans</i>	-	+	V	-	-	-	-	+
<i>B. firmus</i>	-	+	-	-	+	V	+	+
<i>B. insolitus</i>	-	-	-	-	-	V	V	V
<i>B. laterosporus</i>	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>B. lentus</i>	-	+	+	+	+	V	V	V
<i>B. licheniformis</i>	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>B. macerans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. megaterium</i>	-	+	V	V	+	V	+	V
<i>B. mycoides</i>	-	+	-	-	-	-	V	+
<i>B. pantothenicus</i>	-	+	-	-	-	V	V	V
<i>B. polymyxa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. pumilis</i>	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. sphaericus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i>	-	+	V	-	-	V	+	+

V : Değişken

3.3. *Bacillus* Türlerinin İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Peptonlu su (Oxoid CM 9)

Pepton	: 10,0 gr
Sodyum klorid	: 5,0 gr
Distile su	: 1000 ml

Tartılan bu karışım 1000 ml distile su içerisinde çözündürülüp pH $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra tüplere 9'ar ml pipetlenmiştir. Daha sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Standart Plate Count Agar (PCA) (Difco)

Trypton	: 5,0 gr
Yeast extract	: 2,5 gr
Glucose	: 1,0 gr
Agar	: 15, gr
Distile Su	: 1000 ml

pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilip, petrikutularına ilave edilir.

Glukoz Agar (GA)

Peptone	: 10,0 gr
Lab- Lemco powder	: 5,0 gr
NaCl	: 5,0 gr
Glikoz	: 10,0 gr

Agar : 15,0 gr
 Distile Su : 1000 ml

pH $6,9 \pm$ ayarlanıp, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilip, petri kutularına ilave edilir.

3.4. *Bacillus* Suşlarının Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri ve Uygulanan Testler

Katalaz testi

Lam üzerine saf *Bacillus* kolonilerinden bir öze dolusu alınıp, koloni üzerine 2-3 damla %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatarak karıştırılmıştır. Lam üzerinde gaz kabarcıklarının oluşumu reaksiyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir [117].

Hareket (SIM) besiyeri (Oxoid CM 435)

Trypton : 20,0 gr
 Peptone : 6,0 gr
 Ferric amonyum sülfat : 0,2 gr
 Sodium thiosülfat : 0,2 gr
 Agar : 3,5 gr
 Distile Su : 1000 ml

pH $7,3 \pm 0,2$ ayarlanıp tüplere 4 ml ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

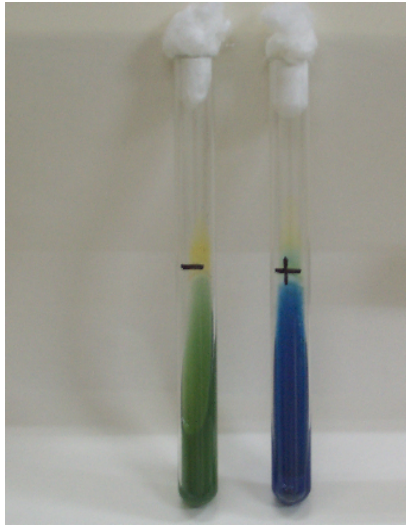
Sivri uçlu bir öze ile saf *Bacillus* kolonisinden bir öze dolusu alınarak tüp içerisindeki agara aşılanmıştır. Tüpler 25 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Agar içerisinde ekim çizgisi boyunca etrafa doğru difüze olmuş bir yayılma görülmüş ve test sonucu pozitif olarak kaydedilmiştir [17].

Simons citrat agar (Oxoid CM 155)

Magnesium sulphate	: 0,2 gr
Amonyum dihydrogen phoshate	: 0,2 gr
Sodium amonium phoshate	: 0,8 gr
Sodium citrate, tribasic	: 2,0 gr
Sodium chloride (NaCl)	: 5,0 gr
Bromthymol blue	: 15,0 gr
Distile Su	: 1000 ml

pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. *Bacillus*'lar yatık agar olarak dökülen bu besiyeri üzerine aşıl原因arak, 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyeri renginin yeşilden koyu mavi renge dönüşümü pozitif olarak değerlendirilmiştir.

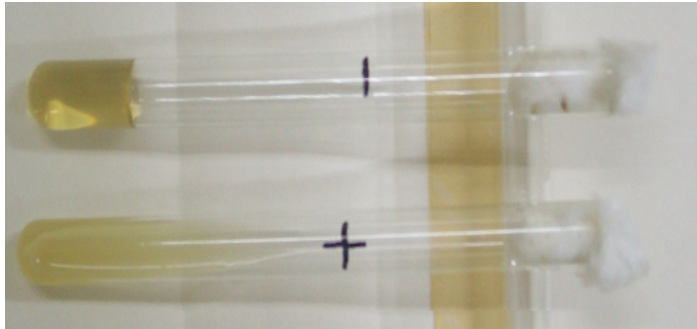


Resim 3.1. Sitrat testi [118]

Nutrient gelatin besiyeri (Oxoid CM 135 a)

Lab-Lemco powder	: 3,0 gr
Pepton	: 5,0 gr
Gelatin	: 120,0 gr
Distile Su	: 1000 ml

pH $6,8 \pm 0,1$ 'e ayarlanıp tüplere 5ml'lik miktarlarda dağıtıldıktan sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Tüplere *Bacillus* kültüründen daldırma ekim yapılmıştır. Tüpler 22°C 'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmış ve -4°C 'de soğutulmuştur. Jelatin hidrolizi testinde pozitiflik besiyerinin sıvılaşması ile anlaşılmıştır [17].



Resim 3.2. Jelatin hidroliz testi [118]

Eskülin Ayrışması Testi

Bir glikozid olan eskulin, etkenlerin enzimleri vasıtasıyla hidrolize edilerek ayrıştırılır. Deney, eskulinli buyyon veya agarda uygulanabilir. Bu test için gerekli materyaller;

Eskülin	: 1,0 gr
Ferrik Sitrat	: 0,5 gr

Pepton	: 10,0 gr
Sodium chloride (NaCl)	: 5,0 gr
Distile Su	: 1000 ml

pH $6,8 \pm 0,1$ ayarlanıp, tüplere 5 ml'lik miktarlarda dağıtıldıktan sonra $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Tüplere *Bacillus* kültüründen ekim yapıp $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1-7 gün kadar inkube edilir. Kültürler her gün gözle kontrol edilirler. Negatif durumlarda, hiçbir değişiklik görülmez. Pozitif olgularda eskulinli brothda siyah-kahverengi renk meydana gelir.



Resim 3.3 Eskulin testi [118]

Üre agar base (Oxoid CM 53)

Pepton	: 1,0 gr
Glucose	: 1,0 gr
Sodium chloride (NaCl)	: 5,0 gr
Disodium phosphate	: 1,2 gr

Potassium dihydrogen phosphate : 0,8 gr
 Phenol red : 0,012 gr
 Agar : 15,0 gr

2,4 gr alınıp 95 ml distile suya ilave edilmiştir.



Resim 3.4. Üre testi [118]

pH $6,8 \pm 0,2$ 'e ayarlanıp $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra 5 ml steril üre ilave edilerek steril tüplere dağıtılmıştır.

Bacillus'lar besiyerine aşılanarak $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyerinde pembe renk oluşumu ile reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiştir [17].

İndol besiyeri (Oxoid CM 87)

Tryptone : 10,0 gr
 Sodium chloride (NaCl) : 5,0 gr

Distile Su : 1000 ml

pH $7,4 \pm 0,2$ 'e ayarlanıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [64]. Besiyerine *Bacillus* türleri aşılannıştır ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerine kovacs ayıracı damlatılmıştır. İndol besiyerinin yüzeyinde kırmızı halka oluşumu ile reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiştir [17].

Kovacs oxidase testi

Tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride : 1,0 gr

Disitle Su : 1000 ml

Distile su içine tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ayıracı ilave edilerek kovacs ayıracı hazırlanmıştır [17].

Triple sugar iron (TSI) agar (Oxoid CM 277)

Lab- Lemco powder	: 3,0 gr
Yeast extract	: 3,0 gr
Pepton	: 20,0 gr
Sodyum klorid (NaCl)	: 5,0 gr
Lactose	: 5,0 gr
Sucrose	: 10,0 gr
Glucose	: 1,0 gr
Ferrik sitrat	: 0,3 gr
Sodyum Thiosulfat	: 0,3 gr
Phenol red	: 0,1 gr
Agar	: 12,0 gr

Distile Su : 1000 ml

pH $7,4 \pm 0,2$ 'e ayarlanıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. *Bacillus*'lar yatık katı agar yüzeyine aşılarp, 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda *Bacillus* suşlarının TSI agar besiyerinde asit üretimi (sarı) veya alkali (kırmızı) üretimine göre test sonuçları değerlendirilmiştir [9,62].



Resim 3.5. TSI testi [118]

Voges proskauer (VP) (Oxoid CM 43)

Pepton : 5,0 gr
 Glucose : 5,0 gr
 Fosfat buffer : 5,0 gr
 Distile Su : 1000 ml

pH $7,5 \pm 0,2$ 'e ayarlanıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. VP sıvı besiyerine *Bacillus* bakterileri aşılarmış ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona

bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda besiyerine 0,6 ml naphtol + ethylalchol karışımı olan VP indikatörü ve 0,2 ml %40 KOH ilave edilmiştir. Test sonucunda pembe renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir [17].

VP indikatör

α - Naphtole	: 5,0 gr
Ethyl alchol	: 100 ml

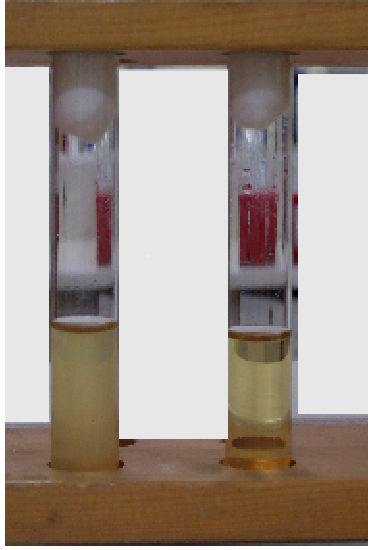
% 40 KOH

Potasyum hidroksit	: 40,0 gr
Distile Su	: 100 ml

% 6,5 NaCl'de Üreme

Pepton	: 10,0 gr
Lab- Lemco powder	: 10,0 gr
Glucose	: 10,0 gr
NaCl	: 65,0 gr
Distile Su	: 1000 ml

pH $7,5 \pm 0,2$ 'e ayarlanıp tüplere 6 ml dağıtılarak 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerine *Bacillus* türleri aşılınmış ve 37°C 'de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteriyel üreme, bulanıklığın oluşumu ile kontrol edilmiştir [17].



Resim 3.6. % 6,5 NaCl'de üreme testi [118]

Nitrat redüksiyonu

Pepton	: 10,0 gr
Sodium chloride (NaCl)	: 5,0 gr
Potasyum nitrate	: 2,0 gr
Agar	: 3,0 gr
Distile Su	: 1000 ml

pH 7,0'e ayarlanıp tüplere 5 ml ilave edilerek, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. *Bacillus* suşları besiyerine aşılanıp, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Test sonucunu değerlendirmek amacı ile tüpteki besiyerinin içersine 1 ml solüsyon A, 1 ml solüsyon B'den pipetlenmiştir. Tüpte kırmızı rengin oluşumu pozitif nitrat redüksiyonunu göstermiştir [17].

Solüsyon A

Sülfanilic asid	: 0,8 gr
Asetik asid (5N)	: 100 cc

Solüsyon B

α - Naphthlamine	: 0,5 gr
Asetik asid (5N)	: 100 cc

5N asetik asid'in hazırlanışı

Asetic asid	: 60 ml
Distile Su	: 140 ml

Karışım sonucunda 200 ml'lik 5N asetik asit elde edilmiştir. Bu karışımın 100 ml'si A solüsyonu için, 100 ml'si de B solüsyonu için kullanılmıştır.

Karbonhidrat fermentasyon besiyeri*Purple broth base*

Protease peptone No: 3	: 10,0 gr
Beef extract (Lab-Lemco powder)	: 1,0 gr
Sodium chloride (NaCl)	: 5,0 gr
Brom Cresol Purple	: 0,02 gr
Distile Su	: 1000 ml

pH $6,8 \pm 0,2$ 'e ayarlanıp indikatör madde ilave edildikten sonra içinde durham tüpü bulunan tüplere 9 ml pipetlenerek, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bakterilerin karbonhidrat testlerinde kullanılan temel besiyeridir. Besiyerlerinin rengi indikatör madde (Brom Cresol Purple) den dolayı koyu menekşe rengindedir [17].

Karbonhidrat solüsyonu

Çalışmamızda kullanılan *Bacillus*'ların karbonhidrat solüsyonları glikoz, ksiloz, laktoz, maltoz, mannitol, sükroz'dur.

Karbonhidrat : 1,0 gr

Distile Su : 10,0 ml

Hazırlanan solüsyonlar 0,2-0,45 μm 'lik membran filtre ile steril edilmiştir. Bu solüsyondan steril pipet ile 1 ml alınıp önceden hazırlanmış 9 ml'lik temel besiyerine (Purple Broth Base) ilave edilmiştir.

Besiyerine 0,2 ml aktif *Bacillus* kültürlerinden alınıp 1-3 gün $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Şekeri kullanarak asit üreten *Bacillus* türleri besiyerinin rengini sarıya dönüştürmüştür. Negatif reaksiyonda ise renk değişikliği gözlenmemiştir.

3.5. *Bacillus* Türlerinin Proteaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Tanımlamaları yapılan *Bacillus* türlerinin proteolitik enzim aktiviteleri Skim Milk Agar (SMA)'da test edilmiştir. Saflaştırılan örneklerden iğne uçlu öze ile alınan bakteriler SMA'a saplama şeklinde (spot on the lawn) inoküle edilmiştir. Bakteriler izole edildikleri sıcaklık derecelerinde inkübasyon sonucu besiyerinde şeffaf zon oluşturan türlerin proteolitik aktiviteleri pozitif ve zon oluşturmayan türler ise negatif olarak değerlendirilmiştir [119,120].

Araştırmamızda mezofilik *Bacillus* türlerinin proteolitik enzim aktiviteleri SMA'da oluşan proteolitik zonların ölçülmesi sonucu belirlenmiştir. Spot on the lawn yöntemi ile inoküle edilen mezofilik *Bacillus* kolonileri yine izole edildikleri sıcaklıkta (37 ± 1 °C'de 24 saat) inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda ekimi yapılan bölge etrafındaki şeffaf alanlar belirlenerek proteolitik zon çapları ölçülmüştür. Koloni etrafında 1 mm'lik hidroliz zonu zayıf proteolitik aktivite (+), 2-3 mm'lik hidroliz zonu orta derecede proteolitik aktivite (++), 3 mm'nin üzerindeki hidroliz zonu kuvvetli proteolitik aktivite (+++) olarak değerlendirilmiştir [119,120].

3.6. *Bacillus* Türlerinin SMA'da Proteaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Besiyerleri

Skim Milk Agar

Solüsyon A

Nutrient Broth	: 1,3 gr
Agar	: 1,6 gr
Distile Su	: 90 ml

pH $6,3 \pm 0,2$ ayarlanıp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

Solüsyon B

%10'luk Skim Milk besiyeri için;

Skim Milk	: 1,0 gr
Distile Su	: 10 ml

1,5 atmosfer basınçta 8 dakika otoklavlanarak steril edilir. Daha sonra her iki besiyeri (Solüsyon A,B) karıştırılarak plaklara dökülür.



Resim 3.7. *Bacillus lentus* T10(14) izolatının SMA'daki kuvvetli proteolitik aktivitesi [118]

3.7. *Bacillus* Türlerinin Lipaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Araştırmamızda mezofilik *Bacillus* türlerinin lipolitik enzim aktiviteleri Tributyrin Agar (TA)'da değerlendirilmiştir. *Bacillus* türlerinin lipaz enzim aktivitesi, oluşan hidroliz zonunun ölçülmesi ile belirlenmiştir. Spot on the lawn yöntemi ile inoküle edilen mezofilik *Bacillus* kolonileri izole edildikleri sıcaklıkta (37 ± 1 °C'de 24 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda ekimi yapılan bölge etrafındaki şeffaf alanlar belirlenerek lipolitik zon çapları ölçülmüştür. Koloni etrafında 1 mm'lik hidroliz zonu zayıf lipolitik aktivite (+), 2-3 mm'lik hidroliz zonu orta derecede lipolitik aktivite (++), 3 mm'nin üzerindeki hidroliz zonu kuvvetli lipolitik aktivite (+++) olarak değerlendirilmiştir.

3.8. *Bacillus* Türlerinin TA'da Lipaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Besiyeri

Tributyrin Agar

Pepton from meat : 2,5 gr

Casein pepton : 2,5 gr

Yeast extract	: 3,0 gr
Agar	: 12,0 gr
Distile Su	: 1000 ml

pH $6,3 \pm 0,2$ 'e ayarlanıp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

Tributyryn : 10,0 ml. Hızla karıştırılan besiyerinin üzerine ilave edilir.



Resim 3.8. *Bacillus* izolatlarının TA besiyerindeki lipolitik aktivitesi (Sağda *B. licheniformis* K15(19) ve üstte *B. megaterium* K9(1)'de kuvvetli lipolitik aktivite, sol altta *B. circulans* K5(10)'da lipolitik aktivite negatif) [118]

3.9. Koliform Grup Mikroorganizma ve *E. coli* Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Besiyeri

Fluorocult (Lauryl sulfate broth) (Merck, 1.12588.0500)

Triptoz	: 20,0 gr
Laktoz	: 5,0 gr
Sodyum klorid	: 5,0 gr
Lauril sulfat sodyum tuzu	: 0,1 gr
di-Potasyum hidrojen fosfat	: 2,75 gr
Potasyum dihidrojen fosfat	: 2,75 gr
L-Tritofan	: 1,0 gr
L Metilumbelliferil-β-D-glukuronid	: 0,1 gr
Distile su	: 1000 ml

Tartılan karışım 1000 ml steril distile suda çözündürülüp, pH : 6,8 ± 0,2'e ayarlandı. 9'ar ml deney tüplerine pipetle aktarıldıktan sonra içlerine hava kabarcığı kalmayacak biçimde yerleştirildi. 121 °C'de 15 d steril edildi.

3.10. Et Örneklerinden Koliform Grup Mikroorganizma ve *E. coli* Varlığının Belirlenmesi

Araştırmada incelediğimiz kuşbaşı, kıyma ve tavuk eti örneklerinde koliform ve *E. coli* varlığı ve En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemi ile kontrol edilmiştir. Analiz için laboratuvara getirilen et örnekleri parçalanmış ve 10'er gr alınarak 90 ml steril peptonlu suda 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} 'lük dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dilüsyonlardan steril edilmiş, içinde durham tüpü bulunan ve 9'ar ml'lik Fluorocult (Lauryl sulfate broth-LSB) tüplerine her dilüsyondan 3'er tüpe 1'er ml ekim yapılmış, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bulanıklık ve gaz oluşumu gözlenen tüpler koliform grubu bakteriler yönünden

pozitif değerlendirilmiştir ve EMS tablosundan (Çizelge 3.3.) koliform sayısı hesaplanmıştır. Koliform grubu pozitif olarak değerlendirilen tüplerde *E. coli* varlığı araştırılmıştır. Bunun için LSB MUG tüpleri karanlık ortamda 366 nm UV ışık lambası altında incelenmiştir. UV ışık altında floresan ışıma veren tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir. *E. coli* bulunan tüplerde besiyeri içeriğinde bulunan MUG indikatörü *E. coli* tarafından hidroliz edilerek 366 nm UV ışık altında mavi floresan veren veren methyllumbelliferon maddesi oluşmaktadır. *E. coli* sayısı da EMS tablosundan (Çizelge 3.3.) hesaplanmıştır.



Resim 3.9. Fluorocult LST Broth'ta
E. coli [121]

Çizelge 3.3. EMS tablosu [83]

Pozitif Tüpler			Sayı Kategorisi		%95 Güvenlik sınırı		%99 Güvenlik sınırı	
1ml	0,1ml	0,01ml	EMS	Kategori	Alt	Üst	Alt	Üst
0	0	0	<0,30	-	0,00	0,94	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,10	3	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	0	1,10	2	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	1	1,50	3	0,50	3,80	0,20	5,20
1	3	0	1,60	3	0,50	3,80	0,20	5,20
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,40	2	0,40	3,50	0,20	4,60
2	1	0	1,50	1	0,40	3,80	0,20	5,20
2	1	1	2,00	2	0,50	3,80	0,20	5,20
2	2	0	2,10	1	0,50	4,00	0,20	5,60
2	2	1	2,80	3	0,90	9,40	0,50	14,20
2	3	0	2,90	3	0,90	9,40	0,50	14,20
3	0	0	2,30	1	0,50	9,40	0,30	14,20
3	0	1	3,80	2	0,90	10,40	0,50	15,70
3	0	2	6,40	3	1,60	18,10	1,00	25,00
3	1	0	4,30	1	0,90	18,10	0,50	25,00
3	1	1	7,50	1	1,70	19,90	1,10	27,00
3	1	2	12,00	3	3,00	36,00	2,00	44,00
3	2	0	9,30	1	1,80	36,00	1,20	43,00
3	2	1	15,00	1	3,00	38,00	2,00	52,00
3	2	2	21,00	2	3,00	40,00	2,00	56,00
3	2	3	29,00	3	9,00	99,00	5,00	152,00
3	3	0	24,00	1	4,00	99,00	3,00	152,00
3	3	1	46,00	1	9,00	198,00	5,00	283,00
3	3	2	110,00	1	20,00	400,00	10,00	570,00
3	3	3	>110,00	-	-	-	-	-

3.11. Kekik (*Satureja wiedemanniana*) Bitkisi Uçucu Yağının Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Satureja wiedemanniana (Lalem.) Velen. bitkisinden elde edilen uçucu yağ Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji laboratuvarından elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan uçucu yağ 1/5 konsantrasyonda seyreltmek için 800 µl etil alkol 200 µl uçucu yağla konularak hazırlanmıştır. Antimikrobiyal etki çalışmaları Agar kuyu difüzyon metoduna göre yapılmıştır [122]. Çeşitli etlerden izole edilen *Bacillus* spp.'lerin aktif kültürleri Mc Farland 4'e göre ayarlanmıştır. Test edilecek bakteriler 50 µl olarak nutrient agar besi ortamına aktarılmış ve dragalski özesi ile besiyerine homojen olarak dağıtılmıştır. Kuyulara 25'er µl kekik yağı, bir kuyuya da kontrol olarak 25 µl etil alkol aktarılmıştır. Plaklar 37 °C'de 1 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyuların etrafında oluşan zonların çapları ölçülmüştür. Bütün denemeler iki paralelli olarak çalışılmış, ortalama standart sapmaları hesaplanmıştır.



Resim 3.10. *S. wiedemanniana* uçucu yağının *B. licheniformis* K11(16) izolatı üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve meydana gelen inhibisyon zon çapı [118]

4. BULGULAR

4.1. Mezofilik *Bacillus* Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

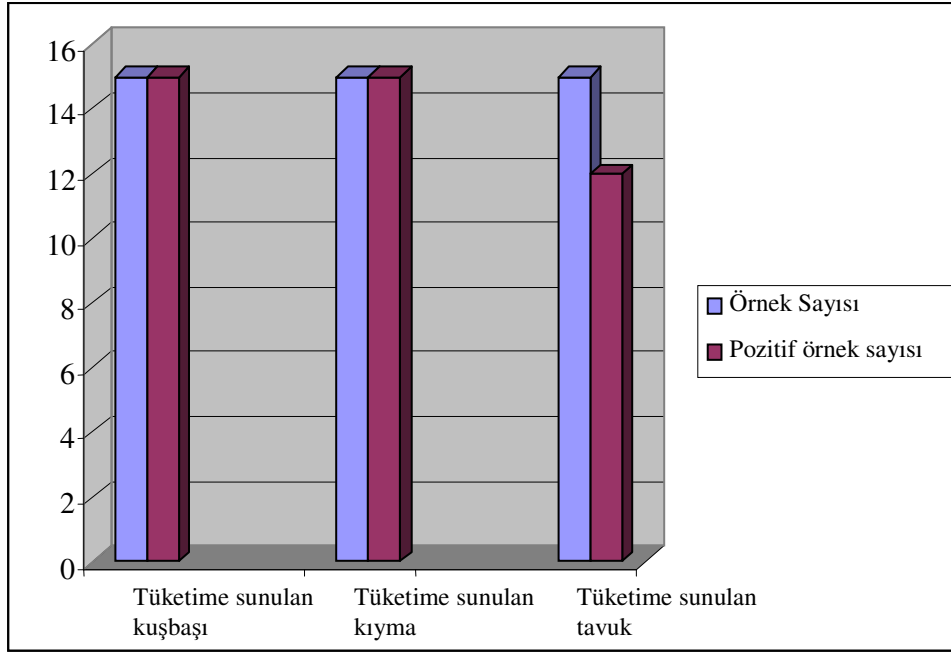
Ankara ilinde çeşitli market ve kasaplardan tüketime sunulan kuşbaşı et, kıyma ve tavuk eti örnekleri nden *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu Bölüm 3.2, 3.3, 3.4’de açıklandığı gibi yapılmıştır.

Araştırmamızda materyal olarak toplam 45 adet (kuşbaşı, kıyma ve tavuk) çeşitli et örnekleri incelenmiştir.

Çizelge 4.1. İzole edilen *Bacillus* türlerinin et örnekleri ve örnek sayısına göre dağılımları

Örnek Çeşidi	Örnek Sayısı	<i>Bacillus</i> saptanan Pozitif örnek Sayısı(%)
Kuşbaşı Et	15	15 (%100)
Kıyma	15	15 (%100)
Tavuk	15	12(%80)
Genel Toplam	45	42 (%93,3)

İncelenen 15’er adet kuşbaşı ve kıyma örneklerinin hepsinden (%100), 15 tavuk eti örneğinden ise 12 (%80)’sinde mezofilik *Bacillus* cinsi bakteri izole edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Bacillus*'ların izole edildiği et örneklerine göre dağılımı

Araştırmamızda incelenen 15 adet kuşbaşı et örneğinden toplam 66 izolat elde edilmiş, elde edilen izolatların 42'si (%63,6) *B. circulans*, 9'u (%13,6) *B. lentus*, 6'sı (%9,0) *B. megaterium*, 4'ü (%6,0) *B. licheniformis*, 3'ü (%4,5) *B. firmus*, 1'i (%1,5) *B. mycoides*, 1'i (%1,5) *B. cereus* olarak tanımlanmıştır.

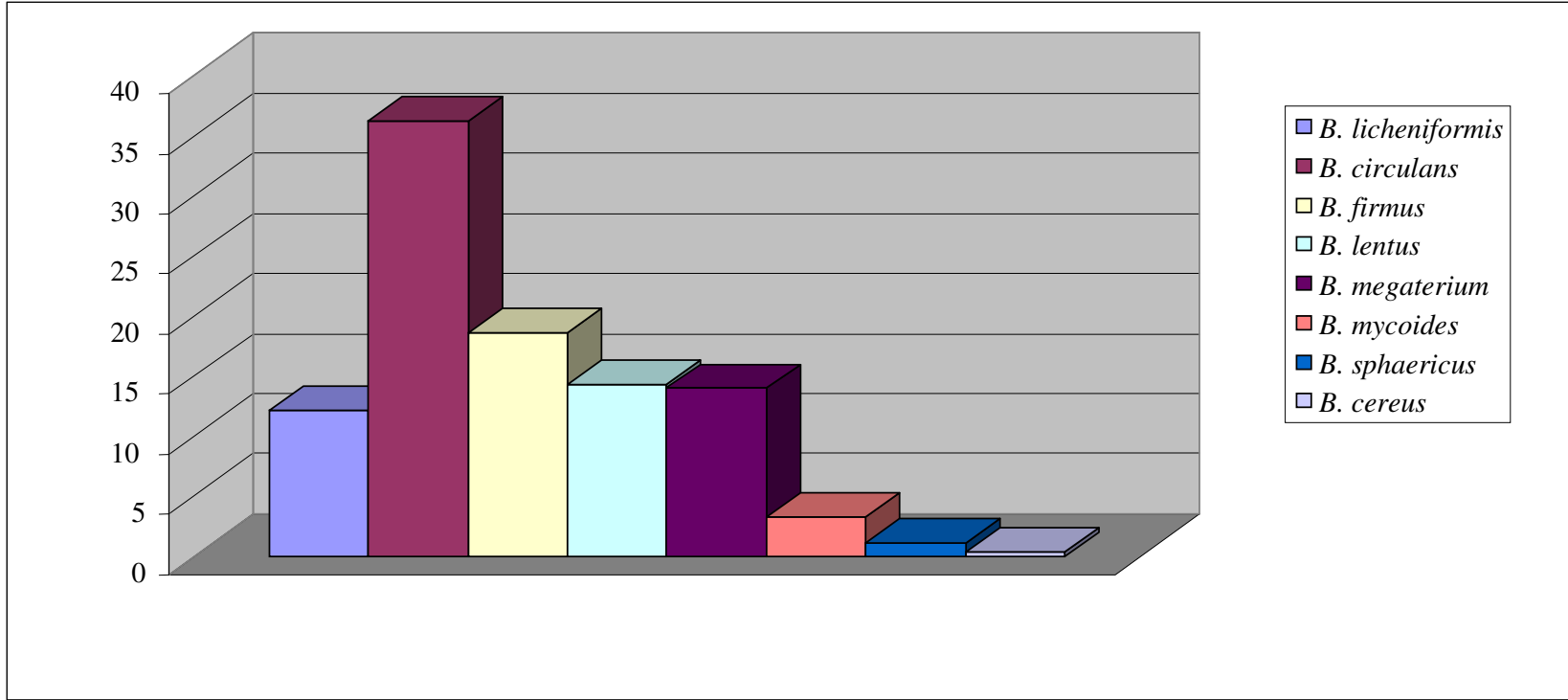
İncelenen 15 kıyma örneğinden ise toplam 176 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların 52'si (%29,5) *B. circulans*, 46'i (%26,1) *B. firmus*, 25'i (%14,2) *B. licheniformis*, 24'ü (%13,6) *B. megaterium*, 23'ü (%13,0) *B. lentus*, 3'ü (%1,7) *B. mycoides*, 3'ü (%1,7) *B. sphaericus* olarak tanımlanmıştır.

12 tavuk eti örneğinden 37 *Bacillus* izolatı elde edilmiş, bu izolatların 9'u (%24,3) *B. megaterium*, 8'i (%21,6) *B. lentus*, 7'si (%18,9) *B. circulans*, 5'i (%13,5) *B. licheniformis*, 5'i (%13,5) *B. mycoides* ve 3'ü (%8,1) *B. firmus* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. İncelenen et örneklerinden izole edilen *Bacillus* türleri ve izolat sayısı

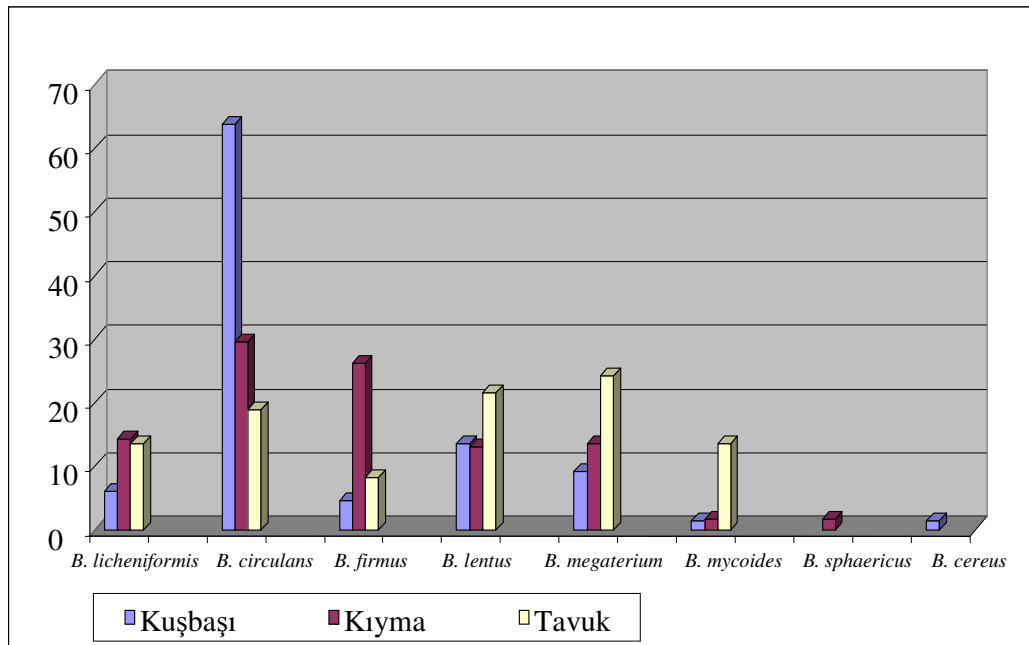
Örnek çeşidi	Toplam izolat sayısı	<i>Bacillus</i> spp. izolat sayısı (%)							
		<i>B. licheniformis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. cereus</i>
Kuşbaşı Et	66	4 (%6,06)	42 (%63,63)	3 (%4,50)	9 (%13,63)	6 (%9,09)	1 (%1,51)	-	1 (%1,51)
Kıyma	176	25 (%14,20)	52 (%29,54)	46 (%26,13)	23 (%13,06)	24 (%13,63)	3 (%1,70)	3 (%1,70)	-
Tavuk	37	5 (%13,51)	7 (%18,91)	3 (%8,10)	8 (%21,62)	9 (%24,32)	5 (%13,51)	-	-
Genel Toplam	279	34 (%12,18)	101 (%36,20)	52 (%18,63)	40 (%14,33)	39 (%13,97)	9 (%3,22)	3 (%1,07)	1 (%0,35)

Yüzdelere izolat sayısına göre alınmıştır.



Şekil 4.2. İncelenen 45 et örneğinden izole edilen toplam 279 *Bacillus* izolatının türlere göre dağılımı

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2’de görüldüğü gibi toplam 45 adet çeşitli et örneğinin analizi sonucu toplam 279 *Bacillus* izolatu elde edilmiş ve bunların 101’i (%36,2) *B. circulans*, 52’si (%18,6) *B. firmus*, 40’ı (%14,3) *B. lentus*, 39’u (%13,9) *B. megaterium*, 34’ü (%12,1) *B. licheniformis*, 9’u (%3,2) *B. mycoides*, 3’ü (%1,0) *B. sphaericus*, 1’i (%0,3) *B. cereus* olarak tanımlanmıştır. Tür dağılımı incelendiğinde en yoğun türler *B. circulans* (%36,2), *B. firmus* (%18,6), *B. lentus* (%14,3), *B. megaterium* (%13,9) ve *B. licheniformis* (%12,1) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. Çeşitli et örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin kaynaklara göre dağılımı

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi kuşbaşı etinden izole edilen *B. circulans* %63,6, *B. lentus* %13,6, *B. megaterium* %9,0, *B. licheniformis* %6,0, *B. firmus* %4,5, *B. mycoides* %1,5, kıymadan izole edilen *Bacillus* yüzdeleri; *B. circulans* %29,5, *B. firmus* %26,1, *B. licheniformis* %14,2, *B. megaterium* %13,6, *B. lentus* %13,0, *B. mycoides* %1,7, *B. sphaericus* %1,7, *B. cereus* %1,5; tavuktan izole edilen *Bacillus* türlerinin izolasyon oranı ise; *B. megaterium* %24,3, *B. lentus* % 21,6, *B. circulans* % 18,9, *B. licheniformis* % 13,5, *B. mycoides* % 13,5 *B. firmus* % 8,1, olarak dağılmıştır. Türlerin dağılımı incelenen et çeşidine göre değerlendirildiğinde; kuşbaşı

ve kıyma örneklerinde en fazla *B. circulans* (%63,6, %29,5), en az *B. mycoides* ve *B. cereus* (%1,5) türleri, tavuk örneklerinde ise en yoğun *B. megaterium* (%24,3), en az sıklıkla *B. firmus* (% 8,1) izole edilmiştir.

4.2. Et Örneklerinden Koliform Grup Mikroorganizma ve *E. coli* Sayımı

Araştırmada incelenen 45 adet et örneğinin EMS yöntemiyle sayıları toplam koliform mikroorganizma ve *E. coli* sayıları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İncelenen tavuk örneklerindeki koliform grubu mikroorganizma ve *E. coli* sayım sonuçları (adet/gr)

Suş Numarası	Pozitif Tüpler			EMS	LST+ MUG Koliform	Pozitif Tüpler			EMS	LST+ MUG <i>E.coli</i>
T1	3	3	3	>110,00	-	0	0	0	<0,30	-
T2	3	3	3	>110,00	-	2	0	0	0,92	0,92x10 ²
T3	3	3	3	>110,00	-	0	0	0	<0,30	-
T4	3	3	2	110,00	0,11x10 ⁵	2	0	0	0,92	0,92x10 ²
T5	3	3	1	46,00	0,46x10 ⁴	3	2	0	9,30	0,93x10 ³
T6	0	0	0	<0,30	-	0	0	0	<0,30	-
T8	3	2	1	15,00	0,15x10 ⁴	2	0	1	1,40	0,14 x10 ³
T9	3	3	0	24,00	0,24x10 ⁴	2	0	0	0,92	0,92x10 ²
T10	3	3	3	>110,00	-	3	1	0	4,30	0,43 x10 ³
T11	3	3	3	>110,00	-	0	0	0	<0,30	-
T12	3	2	0	9,30	0,93x10 ³	0	0	0	<0,30	-
T13	1	3	0	1,60	0,16x10 ³	0	0	0	<0,30	-
T14	1	2	1	1,50	0,15x10 ³	0	0	0	<0,30	-
T15	2	0	0	0,92	0,92 x10 ²	0	0	0	<0,30	-
T16	1	0	0	0,36	0,36x10 ²	0	0	0	<0,30	-

T (Tavuk), Kşb (Kuşbaşı), K (Kıyma)

Çizelge 4.4. İncelenen kuşbaşı ve kıyma örneklerindeki koliform grubu mikroorganizma ve *E. coli* sayım sonuçları (adet/gr)

Suş Numarası	Pozitif Tüpler			EMS	LST+ MUG Koliform	Pozitif Tüpler			EMS	LST+ MUG <i>E.coli</i>
Kşb.1	1	0	0	0,36	$0,36 \times 10^2$	0	0	0	<0,30	-
Kşb.2	3	1	0	4,30	$0,43 \times 10^3$	2	1	0	1,50	$0,15 \times 10^3$
Kşb.12	2	1	0	1,50	$0,15 \times 10^3$	2	0	0	0,92	$0,92 \times 10^2$
Kşb.13	2	1	0	1,50	$0,15 \times 10^3$	2	1	0	1,50	$0,15 \times 10^3$
Kşb.14	3	3	3	>110,00	-	3	3	3	>110,00	-
Kşb.20	0	0	0	<0,30	-	0	0	0	<0,30	-
Kşb.22	3	3	3	>110,00	-	3	3	3	>110,00	-
Kşb.24	3	3	0	24,00	$0,24 \times 10^4$	3	2	0	9,30	$0,93 \times 10^3$
Kşb.25	3	3	3	>110,00	-	2	0	0	0,92	$0,92 \times 10^2$
Kşb.26	3	3	3	>110,00	-	0	1	0	0,30	$0,3 \times 10^1$
Kşb.27	3	3	3	>110,00	-	0	0	0	<0,30	-
Kşb.28	3	3	3	>110,00	-	0	0	0	<0,30	-
Kşb.29	3	0	0	2,30	$0,23 \times 10^3$	0	0	0	<0,30	-
Kşb.30	3	3	2	110,00	$0,11 \times 10^5$	1	0	0	0,36	$0,36 \times 10^2$
Kşb.31	3	3	2	110,00	$0,11 \times 10^5$	1	3	0	1,60	$0,16 \times 10^3$
K1	3	3	3	>110,00	-	3	3	3	>110,00	-
K2	3	3	3	>110,00	-	3	3	2	110,00	$0,11 \times 10^5$
K3	3	3	3	>110,00	-	3	3	3	>110,00	-
K4	3	3	3	>110,00	-	3	3	1	46,00	$0,46 \times 10^4$
K5	3	3	3	>110,00	-	3	3	1	46,00	$0,46 \times 10^4$
K6	3	3	3	>110,00	-	3	3	3	>110,00	-
K7	3	3	2	110,00	$0,11 \times 10^5$	3	3	0	24,00	$0,24 \times 10^4$
K8	3	3	2	110,00	$0,11 \times 10^5$	3	3	1	46,00	$0,46 \times 10^4$
K9	3	3	3	>110,00	-	3	2	0	9,30	$0,93 \times 10^3$
K10	3	3	3	>110,00	-	3	3	2	110,00	$0,11 \times 10^5$
K11	3	3	3	>110,00	-	0	0	0	<0,30	-
K12	3	3	3	>110,00	-	3	3	2	110,00	$0,11 \times 10^5$
K13	3	3	3	>110,00	-	1	2	1	1,50	$0,15 \times 10^3$
K14	3	3	3	>110,00	-	3	0	1	3,80	$0,38 \times 10^3$
K15	3	3	3	>110,00	-	1	0	0	0,36	$0,36 \times 10^2$

T (Tavuk), Kşb (Kuşbaşı), K (Kıyma)

İncelenen 15 adet tavuk örneğinde toplam koliform mikroorganizma sayısı 5 tanesinde $>110,00$, 1 örnekte $1,1 \times 10^4$, 1 örnekte $4,6 \times 10^3$, 1 örnekte $1,5 \times 10^3$, 1 örnekte $2,4 \times 10^3$, 1 örnekte $9,3 \times 10^2$, 1 örnekte $1,6 \times 10^2$, 1 örnekte $1,5 \times 10^2$, 1 örnekte $9,2 \times 10^1$, 1 örnekte $3,6 \times 10^1$ adet/gr bulunmuştur. Aynı örneklerde *E. coli* sayımları, 1 örnekte $9,3 \times 10^2$, 1 örnekte $1,4 \times 10^2$, 1 örnekte $4,3 \times 10^2$, 3 örnekte $9,2 \times 10^1$, 9 örnekte ise $<0,30$ adet/gr olarak hesaplanmıştır.

Yapılan sayımda toplam koliform mikroorganizma sayısı incelenen kuşbaşı örneklerinin 6 tanesinde $>110,00$ adet/gr, 2 örnekte $1,1 \times 10^4$, 1 örnekte $2,4 \times 10^3$, 1 örnekte $4,3 \times 10^2$, 1 örnekte $2,3 \times 10^2$, 2 örnekte $1,5 \times 10^2$, 1 örnekte $3,6 \times 10^1$, 1 örnekte $<0,30$, adet/gr bulunmuştur. Aynı örneklerdeki *E. coli* sayısı 2 örnekte $>110,00$ adet/gr olarak bulunurken, 1 örnekte $9,3 \times 10^2$, 1 örnekte $1,6 \times 10^2$, 2 örnekte $1,5 \times 10^2$, 1 örnekte $3,6 \times 10^1$, 2 örnekte $9,2 \times 10^1$, 1 örnekte $0,3 \times 10^1$, 5 örnekte ise $<0,30$ adet/gr olarak bulunmuştur.

İncelenen 15 adet kıyma örneğin toplam koliform mikroorganizma sayısı 13'ünde $>110,00$ adet/gr, 2 örnekte ise toplam koliform mikroorganizma sayısı $1,1 \times 10^4$ adet/gr olarak hesaplanmıştır. Aynı örneklerde *E. coli* sayısı 3 örnekte $>110,00$ adet/gr bulunurken, 3 örnekte $1,1 \times 10^4$, 3 örnekte $4,6 \times 10^3$, 1 örnekte $2,4 \times 10^3$, 1 örnekte $9,3 \times 10^2$, 1 örnekte $3,8 \times 10^2$, 1 örnekte $1,5 \times 10^2$, 1 örnekte $3,6 \times 10^1$, 1 örnekte $<0,30$ adet/gr olarak hesaplanmıştır.

Araştırmamızda eşit sayıda olarak incelediğimiz et örneklerinde $>110,00$ adet/gr koliform grubu mikroorganizma sayısı kıyma örneklerinin 13'ünde, kuşbaşı et örneklerinin 6'sında, tavuk örneklerinin 5'inde bulunmuştur.

4.3. *Bacillus* Türlerinin Proteaz ve Lipaz Enzim Aktiviteleri

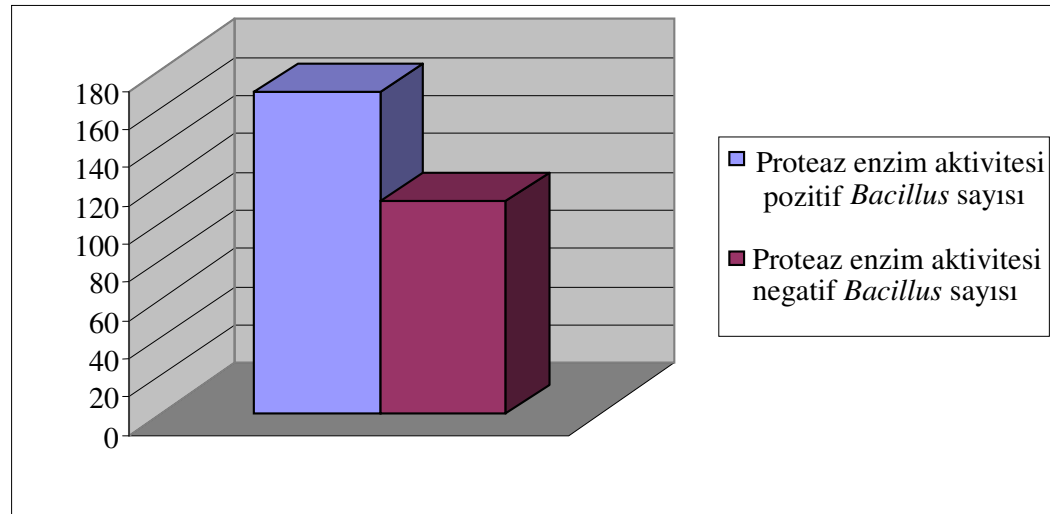
Araştırmamızda et örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatlarının proteaz ve lipaz enzim aktiviteleri çalışılmıştır. Proteolitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi için izolatlar Skim Milk Agar (SMA) besiyerine inoküle edilmiştir. Plaklar mezofilik

Bacillus'lar için 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda aşılana bölge etrafında zonların oluşumu kontrol edilmiş ve değerlendirmeleri yapılmıştır. *Bacillus*'ların SMA besiyerinde proteaz enzim aktivitesi zayıf, orta, yüksek pozitif ve negatif olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Çeşitli et örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatlarının Skim Milk Agar'daki proteaz enzim aktivite sonuçları

<i>Bacillus</i> türlerinin izolasyon sayıları	Proteaz enzim aktivitesi pozitif olan <i>Bacillus</i> sayısı	Proteaz enzim aktivitesi negatif olan <i>Bacillus</i> sayısı
TOPLAM 279	168 (%60,2)	111(%39,7)

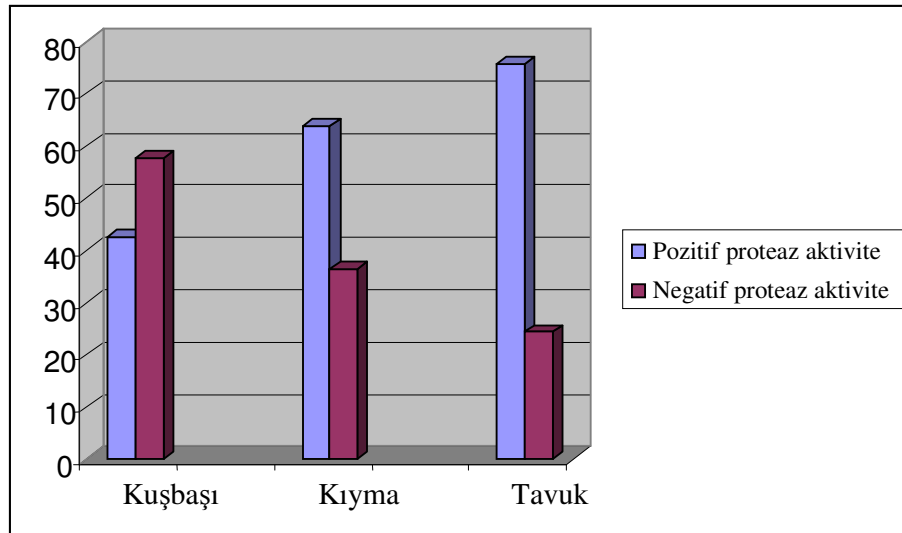
Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4 incelendiğinde proteaz enzim aktivitesi pozitif olan *Bacillus* izolat sayısının 168 (%60,2) , proteaz enzim aktivitesi negatif olan *Bacillus* izolat sayısından 111 (%39,7) fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. Proteaz enzim aktivitesi pozitif ve negatif olan *Bacillus* izolatlarının dağılımı

Çizelge 4.6. *Bacillus* izolatlarının incelenen et çeşitlerine göre proteaz enzim aktivite sonuçları

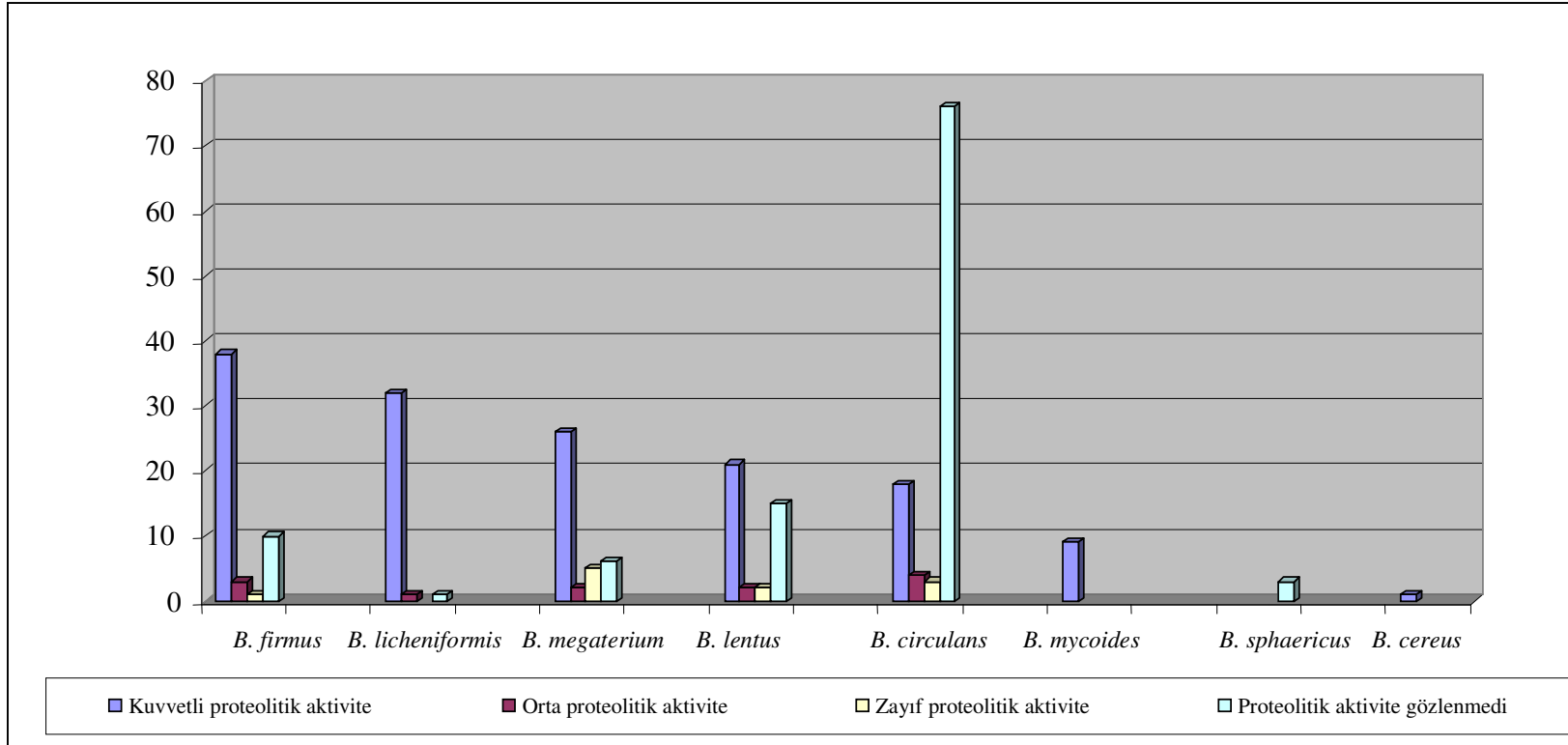
Örnek çeşidi	İzolat Sayısı	Proteaz enzim aktivitesi (+) <i>Bacillus</i> ssp. sayısı	Proteaz enzim aktivitesi (-) <i>Bacillus</i> ssp. sayısı
Kuşbaşı	66	28	38
Kıyma	176	112	64
Tavuk	37	28	9



Şekil 4.5. İncelenen et çeşitlerine göre pozitif ve negatif proteaz enzim aktivitelerinin yüzdesel dağılımı

İncelenen et çeşitlerine göre proteaz enzim aktivitesini değerlendirdiğimizde; kuşbaşından elde edilen 66 izolatın 28'inde (%42,4), kıymadan elde edilen 176 izolatın 112'sinde (%63,6), tavuktan izole edilen 37 izolatın ise 28'inde (%75,6) proteaz enzim aktivitesi pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.6, Şekil 4.5).

Tanımlanan *Bacillus* izolatlarında proteaz enzim aktivitesi kuvvetli, orta ve zayıf pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7-Çizelge 4.14 ve Şekil 4.6).

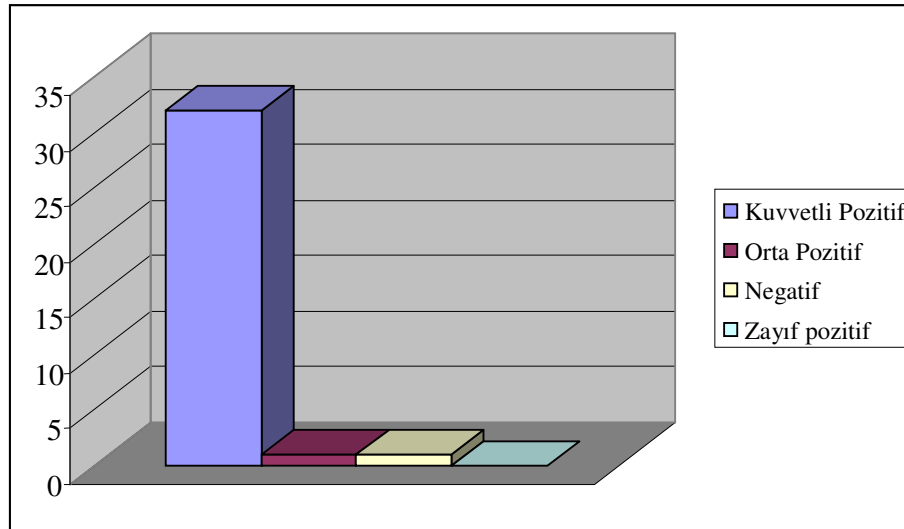


Şekil 4.6. Proteolitik aktivitesi kuvvetli pozitif, orta pozitif , zayıf pozitif ve negatif olan *Bacillus* izolat sayısının türlere göre dağılımı

Çizelge 4.7. *B. licheniformis*'in proteaz enzim aktivite değerleri

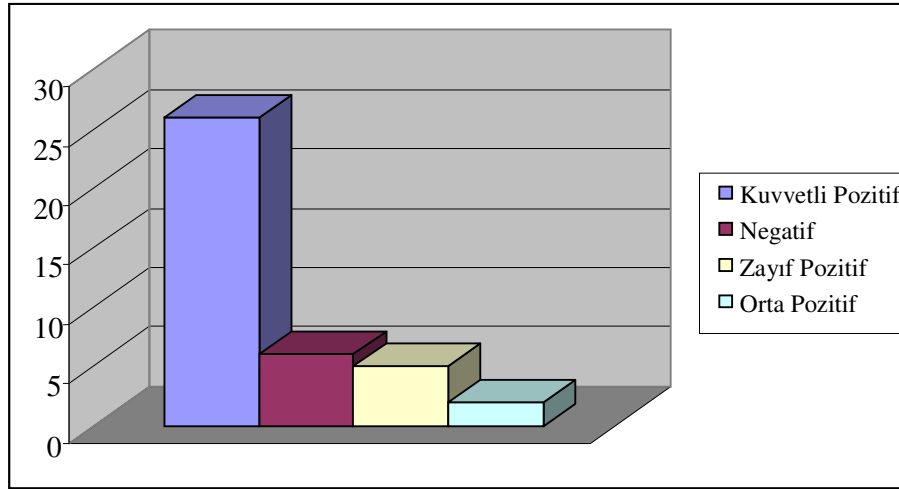
İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	SMA besiyerinde tespit edilen proteolitik aktivite
<u><i>B.licheniformis</i></u> K6(1), K6(18), K6(19),K6(20),K6(23),K6(24),K6(26), K7(16), K11(3), K11(14), K11(15), K11(16), K12(1), K12(2),K12(8), K12(12), K12(15), K14(1), K14(3), K14(7), K14(10), K14(28), K15(1), K15(2), K15(19), Kşb.2(5),Kşb.12(7), Kşb.13(1),T11(1),T1(3),T4(2),T5(3),	+++
T2(2)	++
-	+
Kşb.14(3)	-
Kuvvetli pozitif: 32 Orta: 1 Zayıf: - Negatif: 1 Toplam: 34	

(-) Negatif, (+) zayıf, (++) orta, (+++) kuvvetli pozitif lipolitik aktivite, T (Tavuk), Kşb. (Kuşbaşı), (Kıyma)

Şekil 4.7. *B. licheniformis* izolatlarının proteolitik aktivitesi

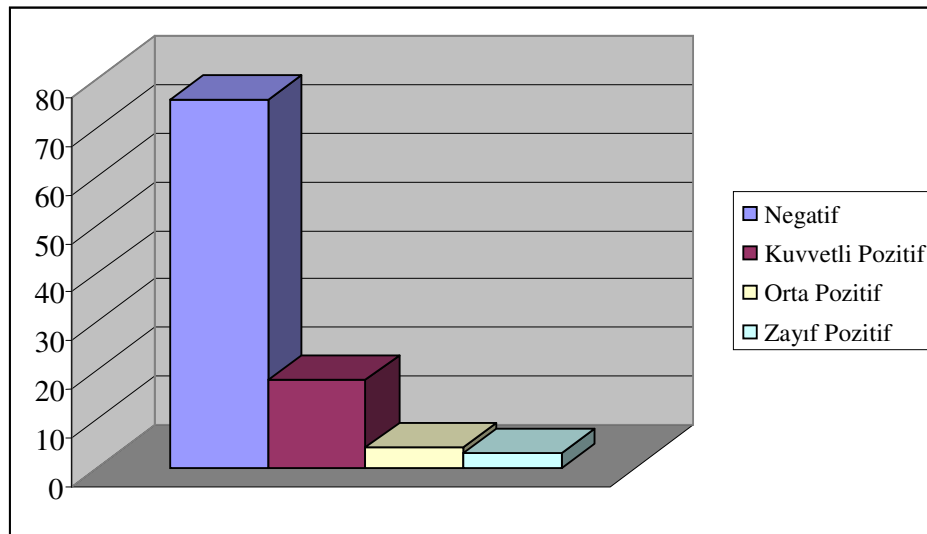
Çizelge 4.8. *B. megaterium*'un proteaz enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	SMA besiyerinde tespit edilen proteolitik aktivite
<u><i>B.megaterium</i></u> K6(3), K6(7), K6(14), K9(1), K11(1), K11(2), K11(4), K11(5), K11(7), K11(13), K12(3), K12(13), K12(14), K14(4), K14(5), K14(9), K14(24), Kşb.25(14), Kşb.26(11), Kşb.31(10), T11(2), T2(1), T2(3), T2(4), T5(1), T5(2),	+++
K11(11), K7(21)	++
K12(5), K14(18), T4(4), Kşb.1(7), Kşb.1(10)	+
K12(4), K13(7), K14(2), Kşb28(7), T10(16), T11(9),	-
Kuvvetli pozitif: 26 Orta: 2 Zayıf: 5 Negatif: 6 Toplam: 39	

Şekil 4.8. *B. megaterium* izolatlarının proteolitik aktivitesi

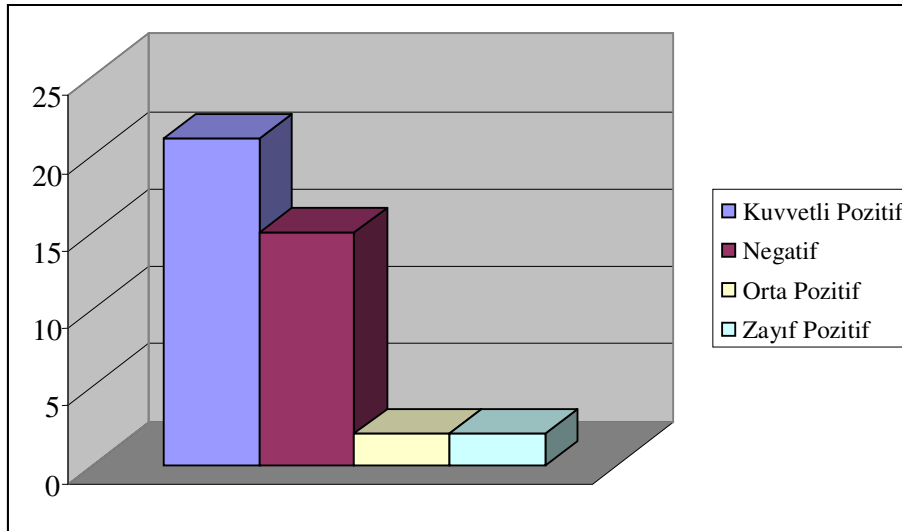
Çizelge 4.9. *B. circulans*'ın proteaz enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>B. circulans</i> 'ın izolat numaraları	SMA besiyerinde tespit edilen proteolitik aktivite
K3(3), K5(22),K5(24),K7(4), K10(4), K14(14), K14(27), Kşb.31(13), Kşb.12(1), Kşb.12(2), Kşb.12(5), Kşb.12(9), T1(4), T4(1), T6(2), T9(2),K7(18), Kşb.29(13)	+++
K2(7), K15(16) , Kşb.31(8), K8(24)	++
K14(22), K15(13), Kşb.26(6)	+
K1(1), K1(2), K1(5), K1(7), K1(8), K2(1), K2(6), K3(1), K3(2), K3(5), K4(c), K4(6),K4(8),K5(1),K5(5),K5(10),K5(11),K5(12), K5(14), K5(18), K5(25), K5(30), K6(5),K7(17),K8(23),K8(25), K9(6),K9(8),K9(15),K10(1),K10(2),K10(14),K11(10),K11(12), K12(6),K12(9), K14(8),K14(19), K15(20),Kşb.25(1),Kşb.25(4), Kşb.25(9), Kşb.25(16) Kşb.26(1),Kşb.26(3),Kşb.26(5),Kşb.26(8), Kşb.26(9), Kşb.27(1),Kşb.27(4),Kşb.27(5),Kşb.27(7),Kşb.27(8), Kşb.28(1),Kşb.28(3),Kşb.28(5),Kşb.28(8),Kşb.28(11),Kşb.28(12), Kşb.28(13),Kşb.29(4),Kşb.29(8),Kşb.29(10),Kşb.30(1),Kşb.30(8), Kşb.30(9),Kşb.30(16),Kşb.30(17), Kşb.31(3), Kşb.31(12), Kşb.31(15),T3(1),T8(1), T11(10), Kşb.22(1),Kşb.24(2),	-
Kuvvetli pozitif: 18 Orta: 4 Zayıf: 3 Negatif: 76 Toplam: 101	

Şekil 4.9. *B. circulans* izolatlarının proteolitik aktivitesi

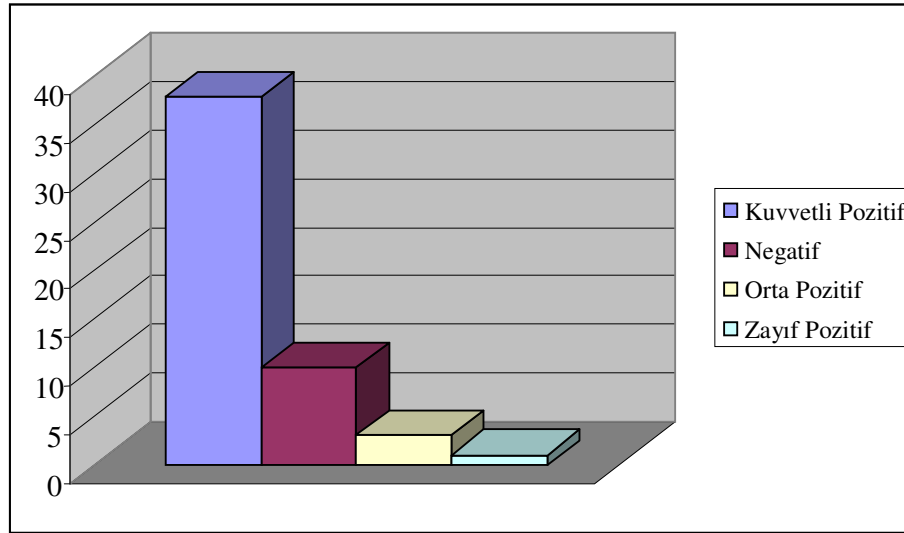
Çizelge 4.10. *B. lentus*'un proteaz enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	SMA besiyerinde tespit edilen proteolitik aktivite
<u><i>B.lentus</i></u> K1(3),K2(9),K4(10), K6(2), K8(b),K8(7), K8(9),K8(15),K9(d),K10(12),K12(16), Kşb25(10),Kşb26(12),Kşb27(12),Kşb29(2), Kşb.31(1), Kşb31 (9),T10(8),T10(14),T15(8),T14(4)	+++
K1(4), Kşb.28(2),	++
K2(5), K3(6),	+
K1(6), K1(10), K2(8), K4(7), K5(15), K5(16), K7(15), K9(3),K10(13), Kşb.27(11), Kşb.31(6), T10(17), T10(18), T11(4), T11(6),	-
Kuvvetli pozitif: 21 Orta: 2 Zayıf: 2 Negatif: 15 Toplam: 40	

Şekil 4.10. *B. lentus* izolatlarının proteolitik aktivitesi

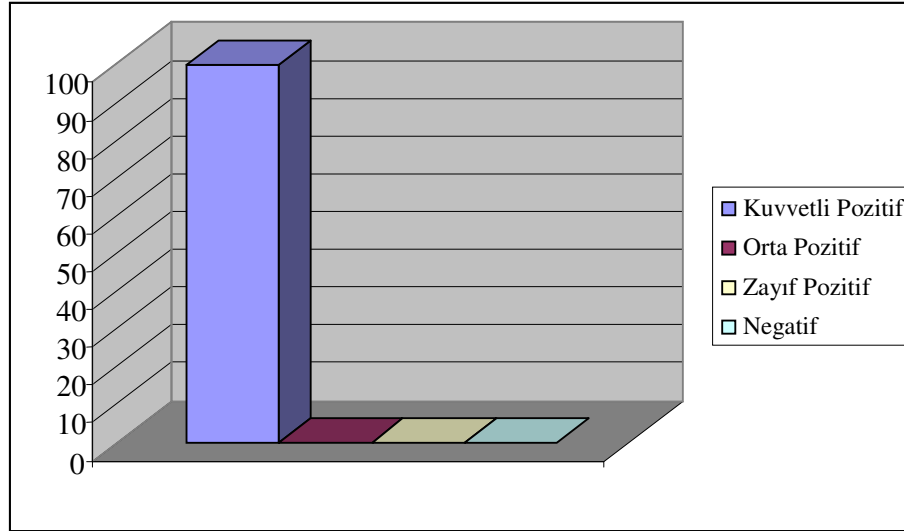
Çizelge 4.11. *B. firmus* proteaz enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	SMA besiyerinde tespit edilen proteolitik aktivite
<u><i>B.firmus</i></u> K3(4), K4(12), K5(20), K5(21), K6(10), K6(13), K7(2), K7(9), K7(13), K7(14), K8(c), K8(d), K8(8), K9(11), K9(a), K9(b), K10(5), K10(7), K10(11), K10(17), K10(19), K11(6), K11(8), K12(18), K13(1), K13(6), K13(16), K13(17), K14(20), K14(21), K14(26), K15(21), Kşb26(10), Kşb30(2), Kşb31(5), T1(5), T8(2), T10(13),	+++
K2(12), K7(6), K13(4),	++
K12(10),	+
K2(10), K5(19), K5(23), K6(6), K7(7), K7(8), K7(10), K13(13), K15(4), K9(16)	-
Kuvvetli pozitif: 38 Orta: 3 Zayıf: 1 Negatif: 10 Toplam: 52	

Şekil 4.11. *B. firmus* izolatlarının proteolitik aktivitesi

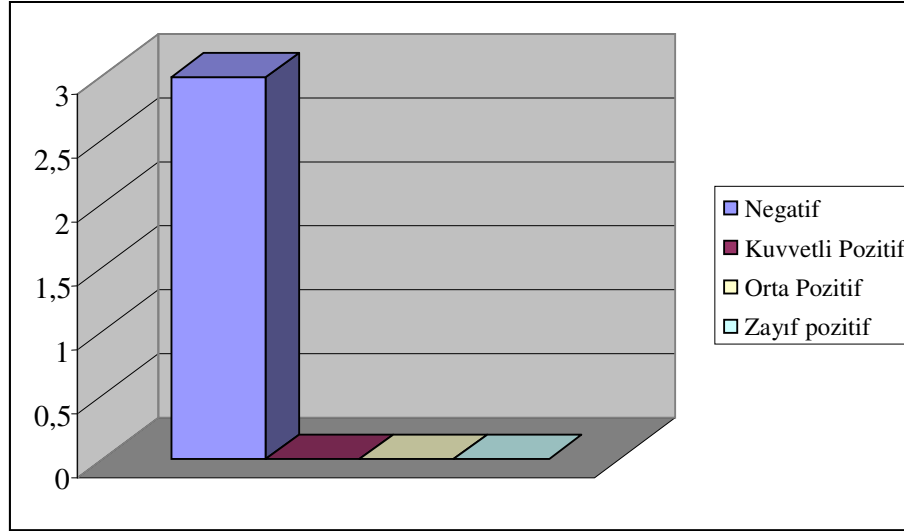
Çizelge 4.12. *B. mycoides*'in proteaz enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türleri ve izolat numaraları	SMA besiyerinde tespit edilen proteolitik aktivite
<u><i>B.mycoides</i></u> K6(25), K10(16), K13(22), Kşb29(3), T11(7),T15(7), T15(12), T11(12),T15(5)	+++
-	++
-	+
-	-
Kuvvetli pozitif: 9 Orta: - Zayıf: - Negatif: - Toplam: 9	

Şekil 4.12. *B. mycoides* izolatlarının proteolitik aktivitesi

Çizelge 4.13. *B. sphaericus*'un proteaz enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	SMA besiyerinde tespit edilen proteolitik aktivite
<u><i>B.sphaericus</i></u>	
-	+++
-	++
-	+
K1(9), K5(29), K8(4)	-
Kuvvetli pozitif: - Orta: - Zayıf: - Negatif: 3 Toplam: 3	

Şekil 4.13. *B. sphaericus* izolatlarının proteolitik aktivitesi

Çizelge 4.14. *B. cereus*'un proteaz enzim aktivite değeri

İzole edilen <i>B. cereus</i> izolat numarası	SMA besiyerinde tespit edilen proteolitik aktivite
Kşb.24(4)	+++
-	++
-	++
-	-
Kuvvetli pozitif: 1 Orta: - Zayıf: - Negatif: - Toplam: 1	

Çizelge 4.7-Çizelge 4.14 incelendiğinde 38 adet (%73,0) *B. firmus*, 32 adet (%94,1) *B. licheniformis*, 26 adet (%66,6) *B. megaterium*, 21 adet (%52,5) *B. lentus*, 18 adet (%17,8) *B. circulans*, (%100) 9 adet *B. mycoides*, 1 adet *B. cereus* izolatında kuvvetli proteolitik aktivite gösterdiği, 4 adet (%3,9) *B. circulans*, 3 adet (%5,7) *B. firmus*, 2 adet (%5,1) *B. megaterium*, 2 adet (%5,0) *B. lentus*, 1 adet *B. licheniformis* (%2,9) türlerinde orta proteolitik aktivite, 5 adet (%12,8) *B. megaterium*, 3 adet (%2,9) *B. circulans*, 2 adet (%5,0) *B. lentus*, 1 adet (%1,9) *B. firmus* türlerinde zayıf proteolitik aktivite gözlenirken 76 adet (%75,2) *B. circulans*, 15 adet (%37,5) *B. lentus*, 10 adet (%19,2) *B. firmus*, 6 adet (%15,3) *B. megaterium*, 3 adet (%100) *B. sphaericus*, 1 adet (%2,9) *B. licheniformis* türlerinde ise proteolitik aktivite negatif olarak belirlenmiştir.



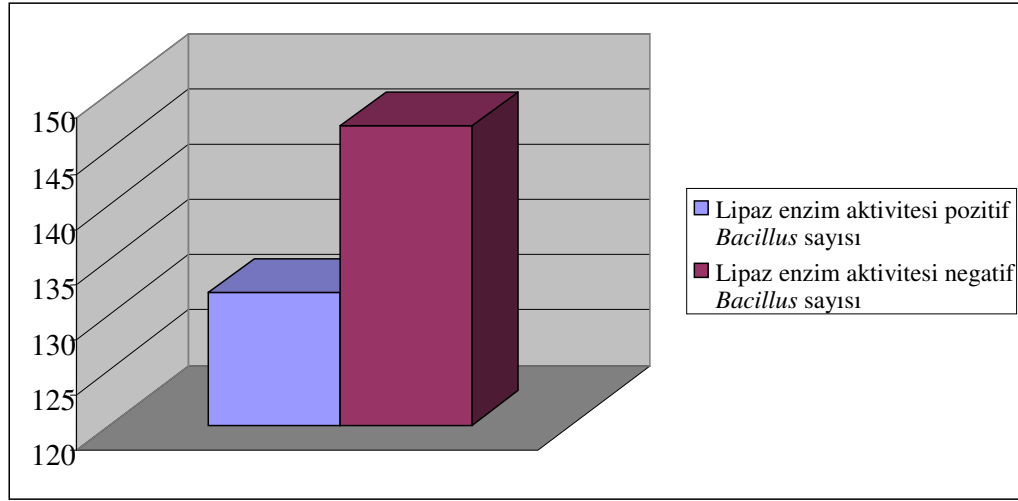
Resim 4.1. *Bacillus licheniformis* K15(1) izolatının SMA'daki kuvvetli proteolitik aktivitesi [118]

Araştırmamızda *Bacillus* izolatlarının lipolitik enzim aktivitesi çalışılmıştır. Lipolitik enzim aktiviteyi tespit etmek için Tributyrin Agar besiyeri kullanılmıştır. İzolatlar Tributyrin Agar besiyerine iğne özeyle inoküle edilmişlerdir. Plaklar mezofilik *Bacillus*'lar için 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda aşılana bölge etrafında zonların oluşumu kontrol edilmiş, kuvvetli, orta, zayıf pozitif ve negatif olarak değerlendirmeleri yapılmıştır.

Çizelge 4.15. Çeşitli et örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatlarının Tributyrin Agar'daki lipaz enzim aktivite sonuçları

<i>Bacillus</i> türlerinin izolasyon sayıları	Lipaz enzim aktivitesi pozitif olan <i>Bacillus</i> sayısı	Lipaz enzim aktivitesi negatif olan <i>Bacillus</i> sayısı
TOPLAM 279	132 (%47,3)	147 (%52,6)

Çizelge 4.15’de tüketime sunulan et çeşitlerinden izole edilen, Tributyrin Agar besiyerinde lipolitik enzim aktivitesi pozitif ve negatif olarak değerlendirilen mezofilik *Bacillus* suşlarının sayısal dağılımları görülmektedir. Çizelgeyi incelediğimizde lipaz enzim aktivitesi pozitif olan *Bacillus* sayısı 132 (%47,3), Lipaz enzim aktivitesi negatif olan *Bacillus* sayısı ise 147 (%52,6) olduğunu görmekteyiz.

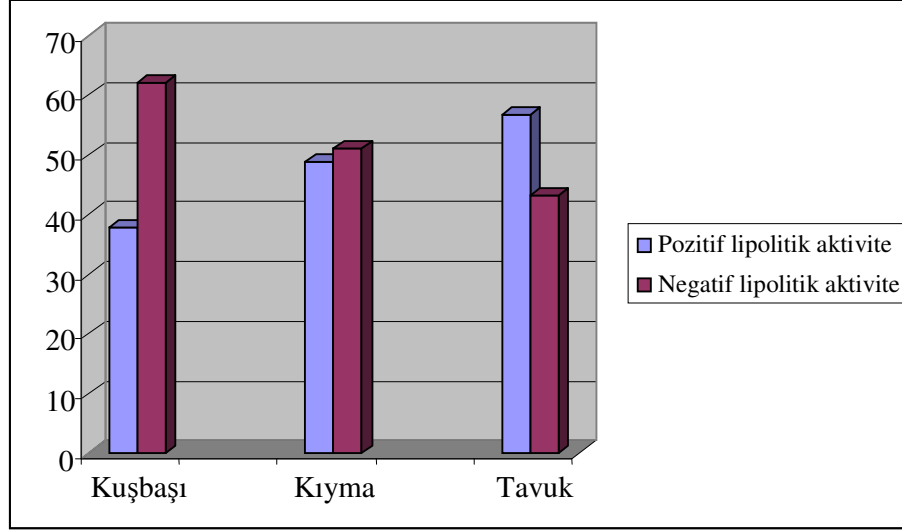


Şekil 4.14. Lipolitik enzim aktivitesi pozitif olan *Bacillus* izolat sayısı ile negatif olan *Bacillus* izolat sayısının sayısal dağılımı

Çizelge 4.16. *Bacillus* izolatlarının incelenen et çeşitlerine göre lipolitik enzim aktivite sonuçları

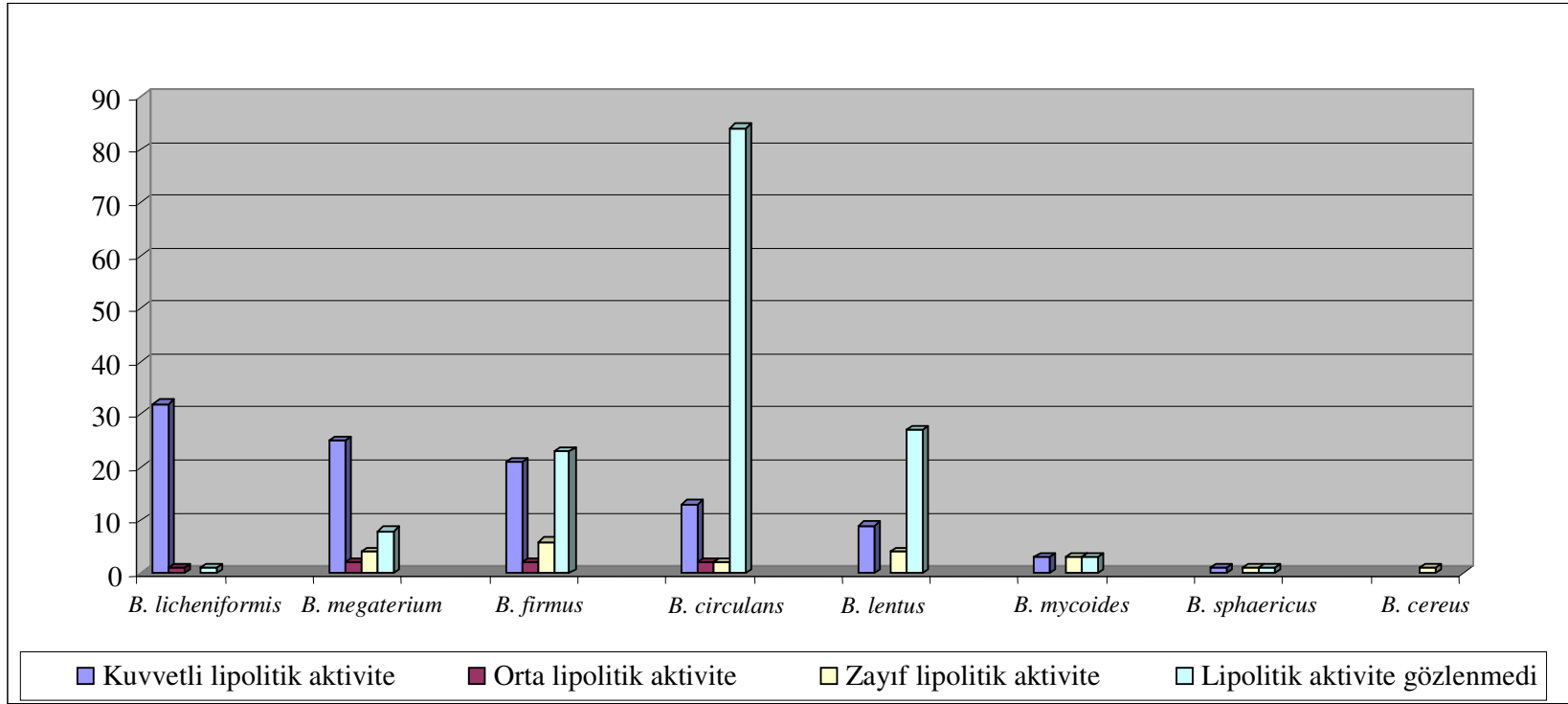
Örnek çeşidi	İzolat Sayısı	Lipaz enzim aktivitesi (+) <i>Bacillus</i> ssp. sayısı	Lipaz enzim aktivitesi (-) <i>Bacillus</i> ssp. sayısı
Kuşbaşı	66	25	41
Kıyma	176	86	90
Tavuk	37	21	16

İncelenen et çeşitlerine göre lipaz enzim aktivitesini değerlendirdiğimizde; kuşbaşından elde edilen 66 izolatin 25'inde (%37,8), kıymadan elde edilen 176 izolatin 86'sında (%48,8), tavuktan izole edilen 37 izolatin ise 21'inde (%56,7) proteaz enzim aktivitesi pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.16, Şekil 4.15).



Şekil 4.15. İncelenen et çeşitlerine göre pozitif ve negatif lipaz enzim aktivitelerinin yüzdesel dağılımı

Tributyryn Agar besiyerinde lipaz enzim aktivitesi, üremenin olduğu bölgedeki zon çapının ölçülmesiyle, kuvvetli, orta, zayıf pozitif ve negatif olan *Bacillus*'ların sayısal dağılımları tespit edilmiştir (Çizelge 4.17-Çizelge 4.24 ve Şekil 4.16).

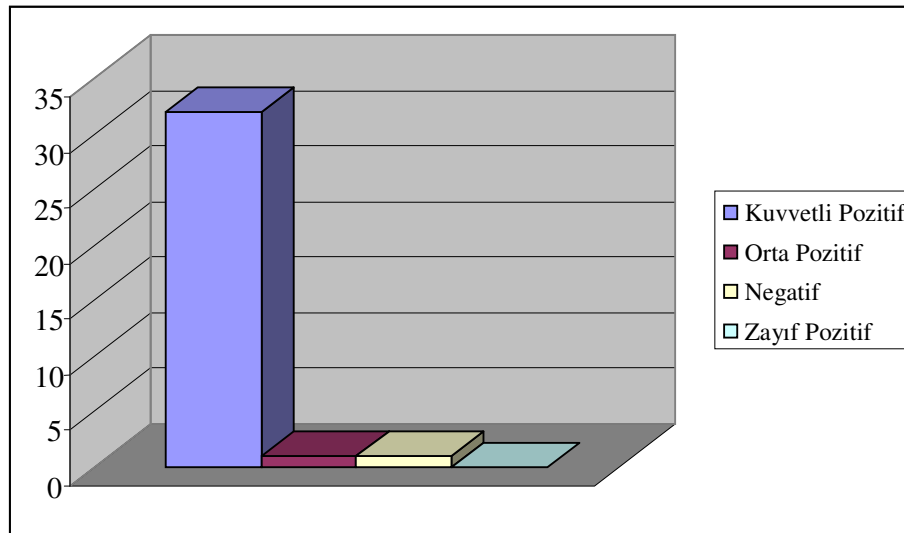


Şekil 4.16. Lipolitik aktivitesi kuvvetli pozitif, orta pozitif, zayıf pozitif ve negatif olan *Bacillus* izolat sayısının türlere göre dağılımı

Çizelge 4.17. *B. licheniformis*'in lipolitik enzim aktivite değerleri

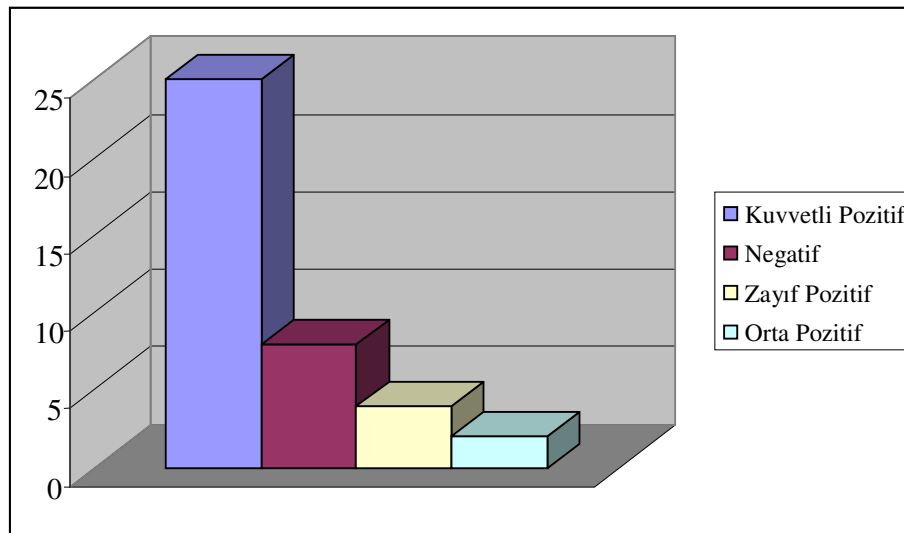
İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	TA besiyerinde tespit edilen lipolitik aktivite
<u><i>B.licheniformis</i></u> K6(1), K6(18), K6(19), K6(20), K6(23), K6(24), K6(26),K7(16), K11(3),K11(14),K11(15),K11(16), K12(1),K12(2),K12(8), K12(12), K12(15), K14(1), K14(3),K14(7),K14(10),K14(28),K15(1), K15(2), K15(19),Kşb.2(5), Kşb.12(7),T11(1),T1(3),T2(2), T4(2),T5(3),	+++
Kşb.13(1)	++
-	+
Kşb.14(3)	-
Kuvvetli pozitif: 32 Orta: 1 Zayıf: - Negatif: 1 Toplam: 34	

(-) Negatif, (+) zayıf, (++) orta, (+++) kuvvetli pozitif lipolitik aktivite, T (Tavuk), Kşb.(Kuşbaşı),K(Kıyma)

Şekil 4.17. *B. licheniformis* izolatlarının lipolitik aktivitesi

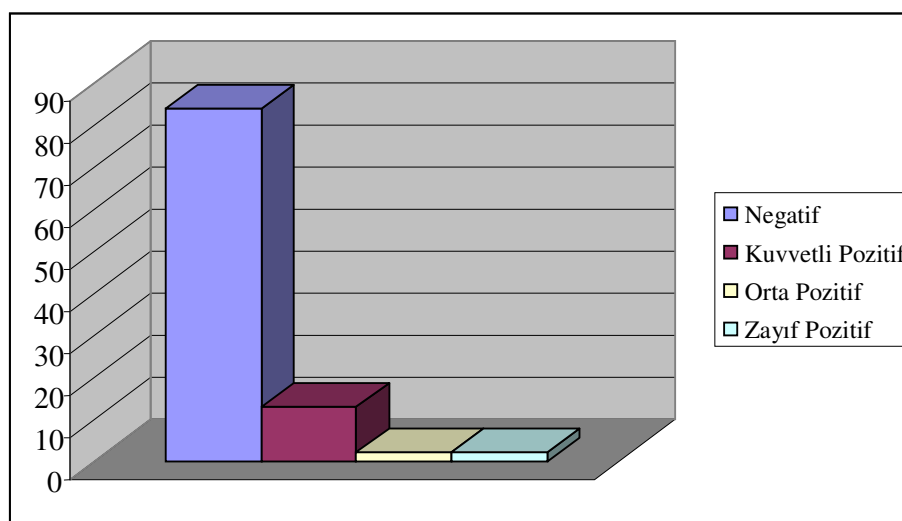
Çizelge 4.18. *B. megaterium*'un lipolitik enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	TA besiyerinde tespit edilen lipolitik aktivite
<u><i>B.megaterium</i></u> K6(3), K6(7), K6(14), K9(1) K11(1), K11(2), K11(4),K11(5), K11(7), K11(11),K11(13),K12(3), K12(13),K12(14),K13(7),K14(4),K14(5),K14(9), K14(24), Kşb25(14), Kşb26(11), Kşb.31(10),T2(3), T2(4),T5(2),	+++
K7(21), K12(5),	++
T5(1), K14(18), Kşb.1(7), Kşb.1(10),	+
T11(2), T2(1), K14(2), T4(4), K12(4), Kşb.28(7), T10(16),T11(9),	-
Kuvvetli pozitif: 25 Orta: 2 Zayıf: 4 Negatif: 8 Toplam: 39	

Şekil 4.18. *B. megaterium* izolatlarının lipolitik aktivitesi

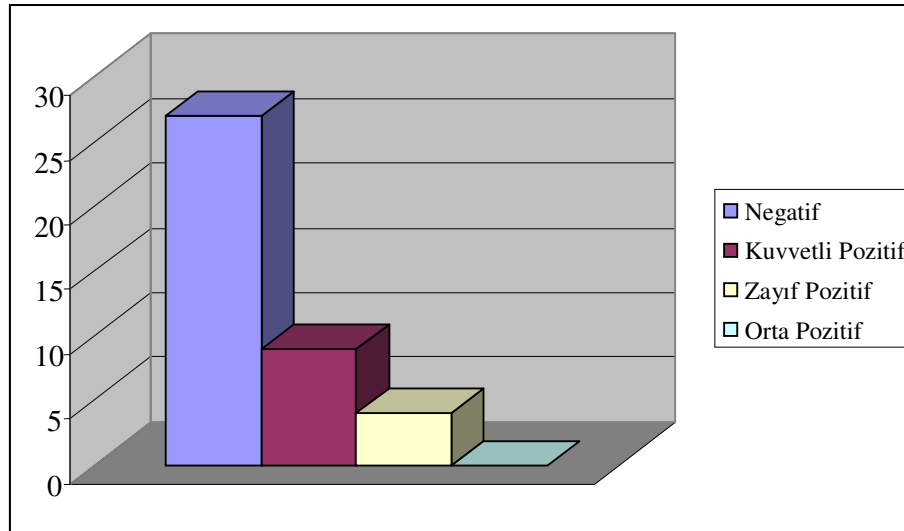
Çizelge 4.19. *B. circulans*'ın lipolitik enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	TA besiyerinde tespit edilen lipolitik aktivite
<u><i>B.circulans</i></u>	
K3(3), K4(c), Kşb.12(2),Kşb.12(5),Kşb.12(9), Kşb.25(4), Kşb.27(5),Kşb.28(5), Kşb.29(10), T1(4),T4(1),T6(2),T9(2),	+++
K10(4), Kşb.12(1),	++
K15(13), K1(5),	+
K1(1), K1(2), K1(7), K1(8), K2(1), K2(6),K2(7),K3(1),K3(2), K3(5),K4(6),K4(8),K5(1),K5(5),K5(10),K5(11),K5(12), K5(14), K5(18),K5(22),K5(24),K5(25),K5(30),K6(5),K7(4),K7(17), K7(18),K8(23),K8(24),K8(25),K9(6),K9(8),K9(15),K10(1), K10(2),K10(14),K11(10),K11(12),K12(6),K12(9),K14(8), K14(14),K14(19),K14(22),K14(27),K15(16),K15(20),Kşb.25(1), Kşb.25(9),Kşb.25(16),Kşb.26(1),Kşb.26(3),Kşb.26(5),Kşb.26(8), Kşb.26(9),Kşb.27(1),Kşb.27(4),Kşb.27(7),Kşb.27(8),Kşb.28(1), Kşb.28(3),Kşb.28(8),Kşb.28(11),Kşb.28(12),Kşb.28(13),Kşb.29(4), Kşb.29(8),Kşb.29(13),Kşb.30(1),Kşb.30(8),Kşb.30(9),Kşb.30(16), Kşb.30(17),Kşb.31(3),Kşb.31(8),Kşb.31(12),Kşb.31(15),T3(1), T8(1),T11(10), Kşb.22(1),Kşb.24(2), Kşb.31(13), Kşb.26(6),	-
Kuvvetli pozitif: 13 Orta: 2 Zayıf: 2 Negatif: 84 Toplam: 101	

Şekil 4.19. *B. circulans* izolatlarının lipolitik aktivitesi

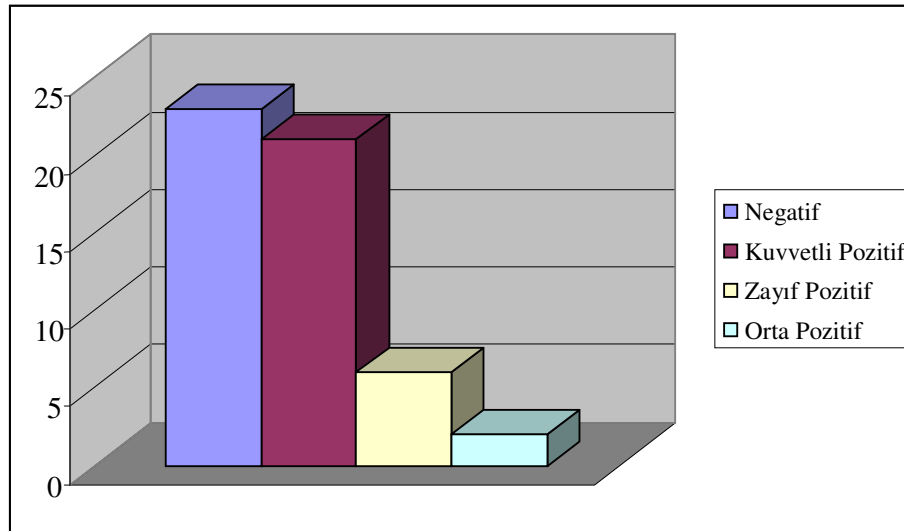
Çizelge 4.20. *B. lentus*'un lipolitik enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	TA besiyerinde tespit edilen lipolitik aktivite
<u><i>B.lentus</i></u> K2(8),K2(9), K5(15), K5(16), K6(2), Kşb25(10), Kşb26(12), T10(8),T15(8),	+++
-	++
K9(d), Kşb.29(2), Kşb.31(1),Kşb.31(6),	+
K1(3),K1(4),K1(6),K1(10),K2(5),K3(6), K4(7),K4(10),K7(15),K8(b),K8(7),K8(9) K8(15),K9(3),K10(12),K10(13),K12(16), Kşb.27(11),Kşb.27(12),Kşb.28(2),Kşb31(9), T10(18),T11(4),T11(6),T14(4),T10(14),T10(17),	-
Kuvvetli pozitif : 9 Orta: - Zayıf: 4 Negatif: 27 Toplam: 40	

Şekil 4.20. *B. lentus* izolatlarının lipolitik aktivitesi

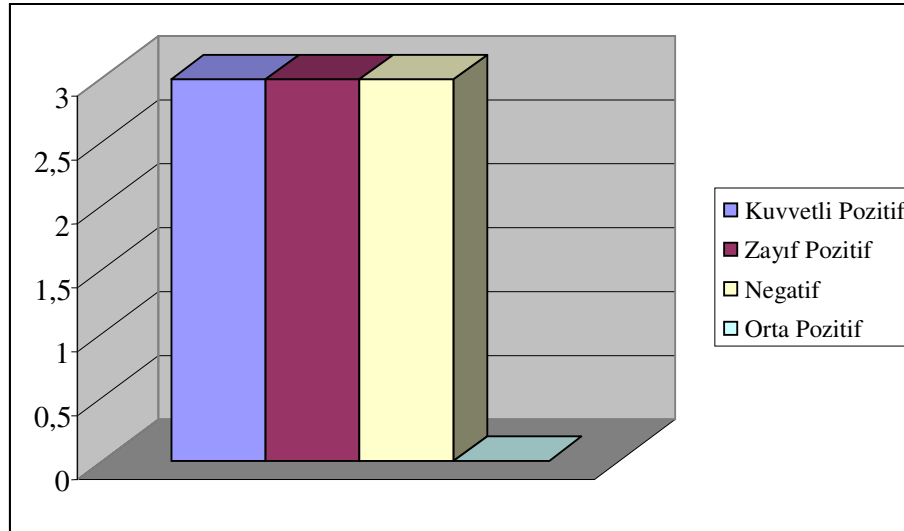
Çizelge 4.21. *B. firmus*'un lipolitik enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	TA besiyerinde tespit edilen lipolitik aktivite
<u><i>B.firmus</i></u> K3(4),K7(2),K8(d), K8(8), K9(b), K9(16) K10(7), K11(6), K11(8), K12(18), K13(1), K13(6),K13(17), K14(20), K14(21), K14(26), Kşb30(2),Kşb31(5), T1(5), T8(2),K5(23)	+++
K15(21), K13(13),	++
K6(10),K6(13), K9(11), K13(4), K2(10), K6(6),	+
K5(19), K7(7), K7(8), K7(10), K15(4), K4(12), K5(20), K5(21), K7(9), K7(13), K7(14), K8(c), K9(a), K10(5),K10(11), K10(17), K10(19),K13(16), Kşb26(10), K2(12), K7(6), K12(10),T10(13),	-
Kuvvetli pozitif: 21 Orta: 2 Zayıf: 6 Negatif: 23 Toplam: 52	

Şekil 4.21. *B. firmus* izolatlarının lipolitik aktivitesi

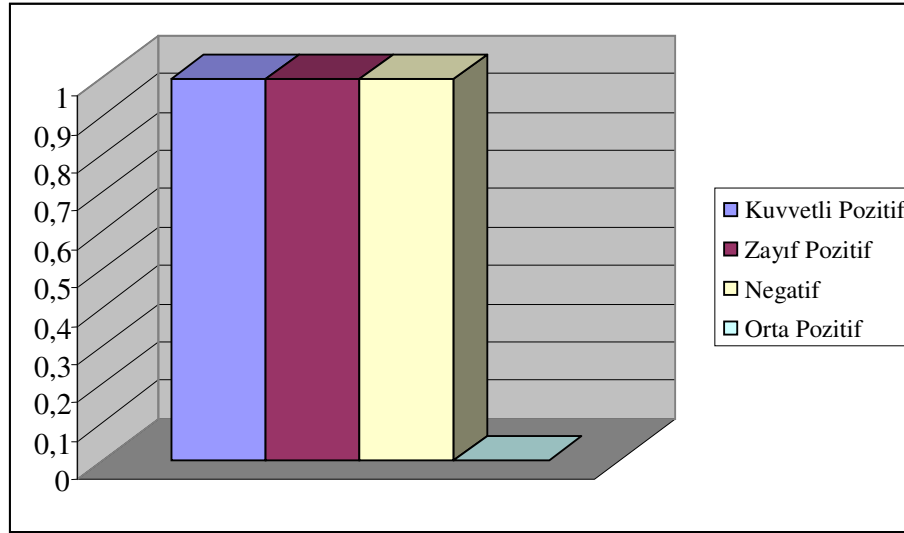
Çizelge 4.22. *B. mycoides*'in lipolitik enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	TA besiyerinde tespit edilen lipolitik aktivite
<u><i>B.mycoides</i></u>	
T11(12), T15(5), Kşb29(3),	+++
-	++
K10(16), T11(7), T15(12),	+
K6(25), T15(7), K13(22),	-
Kuvvetli pozitif: 3 Orta: - Zayıf: 3 Negatif: 3 Toplam: 9	

Şekil 4.22. *B. mycoides* izolatlarının lipolitik aktivitesi

Çizelge 4.23. *B. sphaericus*'un lipolitik enzim aktivite değerleri

İzole edilen <i>Bacillus</i> türü ve izolat numaraları	TA besiyerinde tespit edilen lipolitik aktivite
<u><i>B.sphaericus</i></u>	
K5(29)	+++
-	++
K8(4)	+
K1(9)	-
Kuvvetli pozitif: 1 Orta: - Zayıf: 1 Negatif: 1 Toplam: 3	

Şekil 4.23. *B. sphaericus* izolatlarının lipolitik aktivitesi

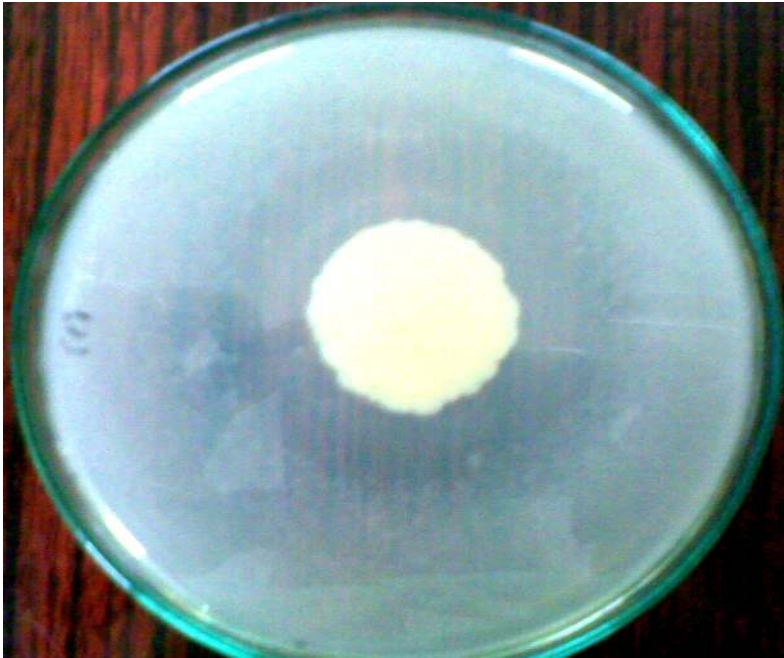
Çizelge 4.24. *B. cereus*'un lipolitik enzim aktivite değeri

İzole edilen <i>B. cereus</i> 'un izolat numarası	TA besiyerinde tespit edilen lipolitik aktivite
-	+++
-	++
Kşb.24(4)	+
-	-
Kuvvetli pozitif: - Orta: - Zayıf: 1 Negatif: - Toplam:1	

Çizelge 4.17-Çizelge 4.24 incelendiğinde 32 adet (%94,1) *B. licheniformis*, 25 adet (%64,1) *B. megaterium*, 21 adet (%40,3) *B. firmus*, 13 adet (%12,8) *B. circulans*, 9 adet (%22,5) *B. lentus*, 3 adet (%33,3) *B. mycoides*, 1 adet (%33,3) *B. sphaericus* türüne ait izolatlarda kuvvetli lipolitik aktivite, 2 adet (%5,1) *B. megaterium*, 2 adet (%1,9) *B. circulans* 2 adet (%3,8) *B. firmus*, 1 adet (%2,9) *B. licheniformis*, suşunda orta lipolitik aktivite, 6 adet (%11,5) *B. firmus*, 4 adet (%10,2) *B. megaterium*, 4 adet (%10) *B. lentus*, 3 adet (%33,3) *B. mycoides*, 2 adet (%1,9) *B. circulans*, 1 adet (%33,3) *B. sphaericus*, 1 adet *B. cereus* suşunun zayıf lipolitik aktivite gösterdiği, 84 adet (%83,1) *B. circulans*, 27 adet (%67,5) *B. lentus*, 23 adet (%44,2) *B. firmus*, 8 adet (%20,5) *B. megaterium*, 3 adet (%33,3) *B. mycoides*, 1 adet (%2,9) *B. licheniformis*, 1 adet (%33,3) *B. sphaericus* türüne ait suşlarda ise Tributyrin Agar besiyerinde ekim yapılan bölgede lipolitik zon gözlenmemiş, yani lipolitik enzim aktivitesi negatif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 4.2. *Bacillus licheniformis* K12(1) izolatının TA'da kuvvetli pozitif lipolitik aktivitesi [118]



Resim 4.3. *B. megaterium* K11(1) izolatında kuvvetli lipolitik aktivite [118]

4.4. Kekik (*Satujera wiedemanniana*) Bitkisi Uçucu Yağının *Bacillus* Türleri Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesi

Çeşitli et örneklerinden izole ettiğimiz toplam 279 *Bacillus* izolatının proteolitik ve lipolitik enzim aktivite sonuçları incelenerek enzim aktivitesi fazla olan 40 *Bacillus* izolatı seçilerek kekik *Satujera wiedemanniana* bitkisi uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde (Çizelge 4.25) *B. megaterium* T11(2) izolatında (17 ± 3 mm), *B. licheniformis* K6(26) izolatında $12\pm 0,0$, *B. licheniformis* K11(16), K12(1), T4(2) izolatında (11 ± 1 mm) ve *B. lentus* (10 mm) izolatında en fazla inhibisyon zon çapları görülmüştür. *B. cereus* Kşb.24(4) izolatında ($3\pm 0,5$ mm) en küçük inhibisyon zon çapı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.25. Kekik (*Satujera wiedemanniana*) uçucu yağının *Bacillus* türleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi ve meydana gelen inhibisyon zon çapları

Tür adı	Suş No	Proteolitik Zon Çapı (mm)	Lipolitik Zon Çapı (mm)	İnhibisyon Zon çapı(mm)
<i>B. licheniformis</i>	K6(23)	$12,0\pm 1,0$	$18,0\pm 0,5$	$9,0\pm 1,0$
<i>B. licheniformis</i>	K6(26)	$16,0\pm 0,5$	$8,0\pm 1,0$	$12,0\pm 0,0$
<i>B. licheniformis</i>	K11(16)	$14,0\pm 0,0$	$10,0\pm 0,6$	$11,0\pm 1,0$
<i>B. licheniformis</i>	K12(1)	$1,0\pm 0,10$	$18,0\pm 2,0$	$11,0\pm 1,0$
<i>B. licheniformis</i>	K12(12)	$14,0\pm 1,0$	$6,0\pm 0,8$	$5,0\pm 1,0$
<i>B. licheniformis</i>	K12(15)	$10,0\pm 2,0$	$12,0\pm 1,3$	$9,0\pm 1,0$
<i>B. licheniformis</i>	K15(19)	$10,0\pm 1,0$	$14,0\pm 0,0$	$8,5\pm 0,5$
<i>B. licheniformis</i>	T4(2)	$6,0\pm 0,5$	$12,0\pm 1,0$	$11,0\pm 1,0$
<i>B. licheniformis</i>	T11(1)	$14,0\pm 2,0$	$6,0\pm 0,5$	$5,5\pm 0,5$
<i>B. megaterium</i>	K6(3)	$16,0\pm 0,0$	$14,0\pm 1,0$	$7,0\pm 1,0$
<i>B. megaterium</i>	K6(7)	$6,0\pm 1,0$	$12,0\pm 0,0$	$10,0\pm 2,0$

(Tavuk), Kşb. (Kuşbaşı), K (Kıyma)

Çizelge 4.25. (Devam) Kekik (*Satujera wiedemanniana*) uçucu yağının *Bacillus* türleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi ve meydana gelen inhibisyon zon çapları

Tür adı	Suş No	Proteolitik Zon Çapı (mm)	Lipolitik Zon Çapı (mm)	İnhibisyon Zon çapı(mm)
<i>B. megaterium</i>	K11(1)	16,0±0,5	12,0±1,5	5,0±1,0
<i>B. megaterium</i>	T2(4)	12,0±1,0	3,0±0,2	4,0±0,0
<i>B. megaterium</i>	T5(1)	6,0±0,2	1,0±0,2	3,5±1,5
<i>B. megaterium</i>	T5(2)	12,0±1,5	6,0±0,5	9,0±1,0
<i>B. megaterium</i>	T11(2)	12,0±1,0	-	17,0±3,0
<i>B. firmus</i>	K4(12)	16,0±0,5	-	6,0±0,0
<i>B. firmus</i>	K8(c)	18,0±1,0	-	8,0±2,0
<i>B. firmus</i>	K8(d)	5,0±2,0	4,0±0,2	7,0±1,0
<i>B. firmus</i>	K11(8)	14,0±1,0	16,0±1,5	7,0±1,0
<i>B. firmus</i>	Kşb30(2)	14,0±1,6	8,0±1,0	7,5±0,5
<i>B. firmus</i>	T1(5)	6,0±0,0	6,0±0,0	9,0±1,0
<i>B. firmus</i>	T8(2)	10,0±1,1	4,0±1,0	4,0±0,0
<i>B. lentus</i>	K8(b)	16,0±1,0	-	6,0±0,0
<i>B. lentus</i>	K8(9)	14,0±0,0	-	3,5±0,3
<i>B. lentus</i>	Kşb.27(12)	16,0±0,5	-	6,0±0,0
<i>B. lentus</i>	T10(8)	4,0±1,0	2,0±0,1	6,0±0,0
<i>B. lentus</i>	T10(14)	14,0±2,0	-	10±0,0
<i>B. lentus</i>	T15(8)	8,0±0,5	4,0±1,0	7,0±1,0
<i>B. lentus</i>	K8(15)	18,0±1,0	-	6,5±0,5
<i>B. circulans</i>	T1(4)	8,0±2,0	10,0±0,0	9,0±1,0

T (Tavuk), Kşb. (Kuşbaşı), K (Kıyma)

Çizelge 4.25. (Devam) Kekik (*Satujera wiedemanniana*) uçucu yağının *Bacillus* türleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi ve meydana gelen inhibisyon zon çapları

Tür adı	Suş No	Proteolitik Zon Çapı (mm)	Lipolitik Zon Çapı (mm)	İnhibisyon Zon çapı(mm)
<i>B. circulans</i>	T4(1)	10,0±0,5	6,0±1,0	6,0±0,0
<i>B. circulans</i>	T9(2)	8,0±1,0	6,0±0,3	8,0±0,0
<i>B. circulans</i>	T6(2)	12,0±0,2	3,0±0,5	3,0±1,0
<i>B. mycoides</i>	T11(7)	8,0±1,0	1,0±0,1	6,0±0,0
<i>B. mycoides</i>	T11(12)	8,0±0,3	7,0±0,0	7,0±1,0
<i>B. mycoides</i>	T15(5)	3,0±0,1	12,0±0,4	8,5±1,5
<i>B. mycoides</i>	T15(12)	12,0±0,6	1,0±0,0	6,0±0,0
<i>B. sphaericus</i>	K5(29)	-	12,0±2,0	5,0 ±1,0
<i>B. cereus</i>	Kşb.24(4)	14,0±1,0	1,5±0,3	3,0±0,5

T (Tavuk), Kşb. (Kuşbaşı), K (Kıyma)



Resim 4.4. *S. wiedemanniana* uçucu yağının *B. licheniformis* K6(23) izolatu üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve meydana gelen inhibisyon zon çapı [118]



Resim 4.5. *S. wiedemanniana* uçucu yağının *B. mycoides* T11(7) izolatu üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve meydana gelen inhibisyon zon çapı [118]



Resim 4.6. *S. wiedemanniana* uçucu yağının *B. cereus* Kşb24(4) izolatu üzerindeki antimikrobiyal etkisi ve meydana gelen inhibisyon zon çapı [118]

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hayvansal gıdalar içerisinde gerek üretim kolaylığı, biyolojik değerlerinin yüksek olması, gerekse de içerdiği B kompleks vitaminleri, çeşitli mineral maddeler (Fe,P,Ca), eksojen aminoasitler, kollagen, glikojen gibi besin öğelerinin yeterli ve dengeli bir oranda olması nedeni ile et, insan beslenmesinde temel gıda maddesi olma özelliğini her zaman taşımaktadır [123].

Hijyenik koşullara uyulmadan hazırlanan ve tüketime sunulan et ve et ürünlerine bulaşan patojen mikroorganizmalar halk sağlığını tehdit eden önemli sağlık problemleri oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalar arasında bulunan *Bacillus* türleri et ve et ürünlerinde vejetatif formları, sporları ve enzimleri ile bulunarak bozulmalarına neden olurlar. Bu nedenle gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyon olaylarında et ve et ürünleri önemli bir yer tutmaktadır. Bu konuda yapılan araştırmalar gıda zehirlenmelerinin %54,7'sinin et ve et ürünlerinin tüketilmesi ile ortaya çıktığını göstermektedir [124].

Bacillus'ların pek çok türü toprak kökenli olup doğada çok yaygındır. Bu türlerden *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. brevis*'in gıda zehirlenmelerine neden olduğu bilinmektedir.

Araştırmamızda incelenen 45 et örneğinden 15 adet kuşbaşı etinin hepsinden (%100), 15 adet kıyma örneğinin yine hepsinden (%100), 15 adet tavuk eti örneğinden ise 12 (%80)'sinde mezofilik *Bacillus* cinsi bakteri izole edilmiştir. İzole edilen *Bacillus* türleri için biyokimyasal ve karbonhidrat fermentasyon testleri yapılarak *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. lentus*, *B. mycoides*, *B. sphaericus* olarak tanımlandırılmıştır (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4).

İzolasyonu gerçekleştirilen 279 adet *Bacillus* izolatının 66'sı kuşbaşı örneğinden elde edilmiş, bu izolatların 42'si (%63,6) *B. circulans*, 9'u (%13,6) *B. lentus*, 6'sı (%9,0) *B. megaterium*, 4'ü (%6,0) *B. licheniformis*, 3'ü (%4,5) *B. firmus*, 1'i (%1,5) *B. mycoides*, 1'i (%1,5) *B. cereus* olarak tanımlanmıştır.

İncelenen kıyma örneğinden ise toplam 176 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların 52'si (%29,54) *B. circulans*, 46'sı (%26,13) *B. firmus*, 25'i (%14,20) *B. licheniformis*, 24'ü (%13,63) *B. megaterium*, 23'ü (%13,06) *B. lentus*, 3'ü (%1,7) *B. mycoides*, 3'ü (%1,7) *B. sphaericus* olarak tanımlanmıştır.

İncelediğimiz tavuk eti örneklerinden ise 37 *Bacillus* izolatı elde edilmiş, bu izolatların 9'u (%24,32) *B. megaterium*, 8'i (%21,62) *B. lentus*, 7'si (%18,91) *B. circulans*, 5'i (%13,51) *B. licheniformis*, 5'i (%13,51) *B. mycoides* ve 3'ü (%8,1) *B. firmus* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3).

B. cereus'un gıdalarda, özellikle tahıllar, süt ve süt ürünleri, baharat gibi kuru içerikli gıdalarda yaygın bir kontaminanttır. *B. cereus*'un hem çiğ etlerde, hem de et ürünlerinde katkı maddesi kontaminantı olarak bulunduğu pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir [125].

B. cereus'dan ileri gelen gıda zehirlenmeleri mikrobiyal gıda zehirlenmeleri içinde önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan araştırmalar, bir toprak basili olan *Bacillus cereus*'un gıdalarda bulunduğunu ve hijyenik olmayan koşullarda, müsait çevre faktörlerinin de mevcudiyeti halinde bol miktarda üreyerek gıda zehirlenmelerine yol açabildiğini ortaya koymuştur [126].

B. cereus'un belirli serovarları gıda içerisinde “emetik toksin” ve “diyarel toksin” olmak üzere 2 tip toksin oluştururlar. Diyarel toksin ısıya duyarlı (60 °C'de birkaç dk'da inaktive olur) iken, emetik olan toksin ısıya karşı oldukça dirençlidir (120 °C'de inaktive olmaz). Diyarel toksin oluşturan izolatları daha çok hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunurken, emetik toksin tahıl ürünlerinde ön plana çıkmaktadır [126].

Ülkemizde farklı yörelere ait çeşitli et örneklerinde *Bacillus* türlerinin bulunma sıklığını içeren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır.

Güven ve arkadaşları tarafından (2005) yapılan bir çalışmada tüketime sunulan çeşitli et ve et ürünlerinde *B. cereus*'un bulunma sıklığını araştırmışlardır. Eskişehir bölgesinde yapılan bu çalışmada incelenen 100 adet çeşitli et ve et ürününün 29 (%29)'unda *B. cereus* izole etmişlerdir [125].

Gökmen ve Alisharlı tarafından (2003) yapılan bir çalışmada, Van merkezinde bulunan farklı market ve kasaplardan temin edilen 100 adeti sığır ve 100 adeti koyun olmak üzere toplam 200 adet hazır kıyma örneğinde *Bacillus* spp. ve *B. cereus* bulunma sıklığını araştırmışlar. Çalışma sonucunda 100 sığır ve 100 koyun kıyması örneğinde sırasıyla 19 (%19), 18 (%18) oranlarında *Bacillus*'a rastlanırken, *B. cereus* sığır kıymalarında %7, koyun kıymalarında %5 oranında belirlenmiştir [126].

Başkaya ve arkadaşları tarafından (2004) İstanbul'da satışa sunulan hazır kıymaların histolojik, mikrobiyolojik ve serolojik kalitesi üzerine yapılan bir araştırmada marketlerden ve şarküterilerden alınan 27 hazır kıyma örneğinde ortalama *B. cereus* sayısı $9,5 \times 10^{-3}$ kob/g olarak bulunmuştur [123].

Elmalı ve Yaman tarafından (2005) Türkiye'nin doğusunda üretilen ve satılan sığır eti ve çiğ kuşbaşı etlerinin mikrobiyolojik kalitesi üzerine yapılan bir çalışmada analiz edilen 50 adet sığır eti örneklerinde ortalama *B. cereus* sayısını $1,2 \times 10^1$ kob/g olarak bulmuşlardır. İncelenen 50 adet çiğ kuşbaşı etinde ise ortalama *B. cereus* sayısı $1,5 \times 10^1$ kob/g düzeyinde bulunmuştur [127].

Son yıllarda bu konuda yurtdışında yapılan benzer çalışmalar ve sonuçları ise şöyledir;

Uzeh ve arkadaşları tarafından (2006) Nijerya'da çiğ et ve pişirilmiş et ürünlerinde mikrobiyal kontaminasyon tespiti için yapılan çalışmada *B. cereus* çiğ et ve hazır et ürünlerinde tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda pişirilmiş et ürününde *B. cereus* ve diğer bakteriler 7×10^2 - 171×10^2 kob/g arasında, çiğ et örneklerinde ise 20×10^2 - 289×10^2 kob/g düzeyleri arasında bulunmuştur. Pişirilmiş et ürününde *B. cereus*

bulunmasının, bu mikroorganizmanın hazır et ürününe, işleme tabi tutulduktan sonra kontamine olduğu veya etin zayıf işlemden geçirilmesinin neden olduğu bildirilmiştir [128].

Smith ve arkadaşları tarafından (2004) Amerika’da yapılan bir çalışmada, marketlerden alınan beş tavuk et ürünü *B. cereus* varlığı için değerlendirilmiştir. Örneklerin üçü pişirilip dondurulmuş, ikisi ise çiğ olarak alınmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda elde edilen 60 izolatın 27’sinde *B. cereus* tespit edilmiştir. Pişirilip dondurulmuş 36 et örneğinden 25’inde, 12 adet çiğ et örneğinden 2’sinde *B. cereus* tespit etmişlerdir. 12 adet olarak alınan diğer çiğ et örneğinde ise *B. cereus*’a rastlanmamıştır. Bu çalışmada test edilen beş farklı tavuk eti örneğinden dördünde *B. cereus* tespit edilmiş, en yüksek oranın ise pişirilip soğutulmuş üç örnekte olduğu bildirilmiştir [129].

Nortje ve arkadaşlarının (1999) Güney Afrika’da yaptıkları araştırmada süpermarketlerden alınan 51 adet çeşitli et örneklerinin 9 (%17,6)’unda *B. cereus* tespit edilmiştir [130].

Giffel ve arkadaşları tarafından (1996) Hollanda’daki gıdalarda *B. cereus* ve *B. subtilis*’in bulunma sıklığı üzerine bir araştırma yapılmıştır. Toplam olarak 229 adet çeşitli gıda örneği (et ürünleri, süt, maya, un, makarna, çin yemeği, kakao, çikolata, fırın ürünleri, çeşni veren ot ve baharatlar) analiz edilmiştir. 229 örneğin 109 (%48)’unda *Bacillus cereus* varlığı tespit edilmiştir. *B. subtilis* 72 örneğin 18 (%25)’inde tespit edilirken 72 örneğin 12 (%17)’sinden *B. cereus* ve *B. subtilis*’in her ikisi de izole edilmiştir. Toplamda muhtemel 91 *B. cereus* kolonisi çeşiti örneklerden izole edilmiştir. ISO konformasyon ve API 50 CHB testlerine göre bu izolatların 81 (%89)’inin *B. cereus* olduğu doğrulandı. Şüpheli 50 *B. subtilis* kolonisinden 10 tanesi API 50 CHB’de sorbitolü fermente edememesi ve karbonhidratı kullanamaması temeline göre *B. pumilis* olarak tanımlandı. Kalan 40 izolatın 30 (%75)’u yapılan testlere göre *B. subtilis* olarak, 4 (%10)’ü *B. licheniformis* ve 6 (%15)’si *B. amyloliquefaciens* olarak tespit edilmiştir [131].

Bizim araştırmamızda *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* türleri izole edilmezken *B. licheniformis* incelenen tüm örneklerden %12,1 oranında bulunmuştur.

Petrova (1975) Bulgaristan’da yaptığı bir araştırmada konserve etlerden izole edilen, toplam 50 tane *Bacillus* suşunun kültürel, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri çalışılmıştır. Çalışılan izolatların %50’si *B. licheniformis*, %26’sı *B. subtilis*, %20’si *B. pumilis* ve %4’ü *B. cereus* olarak tanımlanmıştır [132].

Bu çalışmada ise incelediğimiz tüm et örneklerinde en fazla *B. circulans* (%36,2) bulunurken, *B. pumilis* hiç izole edilmemiştir.

Bu sonuçlardan farklı olarak Schellhass (1982), tüketime sunulan kıymalarda *Bacillus* spp. %89 (65/73) oranında izole ederken, bunlar içerisinde hiç *B. cereus* identifiye edilmediğini bildirmiştir [126].

Bizim çalışmamızda ise incelediğimiz tüm et örneklerinden yalnız 1 örnekte %0,3 oranında *B. cereus* bulunmuştur.

Yaptığımız bu araştırmada incelediğimiz et örneklerinden gıda zehirlenmesine neden olan türlerden 34 (%12,18) adet *B. licheniformis*, 1 adet (%0,35) ise *B. cereus* izole edilmiştir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda ise Kıymet ve arkadaşları (2005) inceledikleri et örneklerinde 29 adet (%29) *B. cereus* izole etmişler, Gökmen ve Alışarlı tarafından (2003) yapılan araştırmada ise, *B. cereus* sığır kıymalarında %7, koyun kıymalarında %5 oranında belirlenmiştir. Smith ve arkadaşları (2004) 60 et örneğinin 27’sinde (%45) *B. cereus* tespit ederken, Schellhass (1982) yaptığı çalışmada *Bacillus* spp. %89 (65/73) oranında izole ederken, bunlar içerisinde hiç *B. cereus* identifiye edilmediğini bildirmiştir.

Araştırmamızda incelediğimiz 45 et örneğinde *Bacillus* izolasyonu ile birlikte *E. coli* ve kloroform mikroorganizmaların sayısı EMS yöntemi ile belirlenmiştir.

Yaptığımız sayımda incelenen 15 adet kıyma örneğinin 13'ünde, 15 adet kuşbaşı örneğinin 6'sında, 15 adet tavuk örneğinin 5'inde toplam koliform mikroorganizma sayısı $>110,00$ adet/gr hesaplanmıştır. İncelenen 15 adet tavuk örneğinin 7'sinde, 15 adet kuşbaşı örneğinin 7'sinde, 15 adet kıyma örneğinin 2'sinde toplam koliform mikroorganizma sayısı $10^2 - 10^4$ adet/gr olarak bulunmuştur. İncelenen 45 adet et örneğinin 2'sinde toplam koliform mikroorganizma sayısı $<0,30$ adet/gr bulunmuştur.

İncelenen et örneklerinde *E. coli* sayısı da hesaplanmıştır. Buna göre 15 adet kıyma örneğinin 3'ünde, 15 adet kuşbaşı örneğinin 2'sinde *E. coli* sayıları $>110,00$ adet/gr olarak bulunurken, 15 adet tavuk örneğinin hiçbirinde *E. coli* sayısı $>110,00$ adet/gr bulunmamıştır. İncelenen 15 adet kıyma örneğinin 10'unda, 15 adet kuşbaşı örneğinin 4'ünde, 15 adet tavuk örneğinin 3'ünde *E. coli* sayısı $10^2 - 10^4$ adet/gr olarak hesaplanmıştır. Analiz edilen 45 et örneğinin 15'inde *E. coli* sayısı $<0,30$ adet/gr bulunmuştur.

Efe ve Gümüşsoy (2005) tarafından Ankara'da yapılan bir araştırmada incelenen 50 adet bütün tavuğa ait but örneklerinde ortalama *E. coli* sayısı $1,2 \times 10^2$, koliform grubu bakteri sayısı $7,2 \times 10^2$, deri numunelerinde *E. coli* sayısı $3,3 \times 10^1$, koliform grubu bakteri sayısı $1,1 \times 10^2$, göğüs numunelerinde ise *E. coli* sayısı $1,1 \times 10^2$, koliform grubu bakteri sayısı $1,2 \times 10^2$ kob/g olarak bulmuşlardır [133].

Elmalı, ve Yaman tarafından (2005) Türkiye'nin doğusunda üretilen ve satılan çiğ kuşbaşı etlerinin mikrobiyolojik kalitesi üzerine yapılan bir çalışmada analiz edilen 50 adet çiğ kuşbaşı örneklerinde *E. coli* sayısı $1,2 \times 10^3$, *E. coli* 0 157 H7 $<2,0 \times 10^2$ koliform grubu bakteri sayısı $1,7 \times 10^4$ cfu/g düzeyinde saptamışlardır [127].

Başkaya ve arkadaşları tarafından (2004) İstanbul'da satışa sunulan hazır kıymaların histolojik, mikrobiyolojik ve serolojik kalitesi üzerine yapılan bir araştırmada İstanbul'daki kasaplardan, marketlerden ve şarküterilerden toplam 27 hazır kıyma örneği toplanmıştır. Mikrobiyolojik analizler sonucunda toplam koliform grubu

mikroorganizma sayısı $3,3 \times 10^2$ - $6,2 \times 10^4$; *E. coli* sayısı $< 1,0 \times 10^2$ - $1,4 \times 10^4$ olarak bulunmuştur [123].

Sağun ve ark. (1996), Van'da yaptıkları çalışmada piliç but ve göğüs etlerinden sırasıyla $7,2 \times 10^2$ kob/ g ve $1,3 \times 10^2$ kob/g düzeyinde *E. coli* izole etmişlerdir [134].

Sağun ve ark. (1996), araştırmalarında koliformları ortalama olarak, but örneklerinde $9,6 \times 10^2$ kob/g, göğüs örneklerinde $1,4 \times 10^3$ kob/g olarak bulmuşlardır [134].

Anar ve ark. (1992), inceledikleri tavuk butlarının % 32'sinde *E. coli* rastladıklarını bildirmişlerdir [135].

Kundakçı ve ark. (1991), 0 °C'de depolanan tavuk etlerinde 16. günde yapılan incelemede, but kısmında $6,9 \times 10^3$ kob/cm² ve göğüs kısmında $6,3 \times 10^3$ kob/cm² olarak koliform grubu mikroorganizma varlığını bildirmişlerdir [136].

Nair ve ark. (1990), Hindistan'daki marketlerde tüketime sunulan 50 adet broilerlerin tamamında 10^2 - 10^4 kob/g düzeyinde *E. coli* saptamışlardır [137].

Gökalp ve ark. (1987), but örneklerinde $1,7 \times 10^5$ kob/g ve göğüs örneklerinde $1,2 \times 10^4$ kob/g düzeyinde koliform grubu mikroorganizma saptamışlardır [138].

Yurtyeri (1980) 100 adet paketlenmiş pilicin tamamında enterobakteri tespit etmiştir [139].

Mikrobiyal enzimler katalitik aktivitelerinin çok farklı, yüksek ürün imkanı, genetik manipilasyonlarının kolay olması, mevsimsel değişiklikler olmadığı için düzenli kaynak olmaları ve pahalı olmayan ortamlarda hızlı üremelerinden dolayı bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerden daha kullanışlıdır. Mikrobiyal enzimler ayrıca bitki ve hayvan enzimlerinden daha kararludur ve mikroorganizmaların ürünleri daha kullanışlı ve güvenlidir.

Proteazlar (serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar, metal proteazlar) dünya çapındaki toplam enzim satışlarının % 60'ından sorumlu olan endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından birini teşkil etmektedir. Bakteriyal proteazlar, proteazlar arasında hayvan ve fungal proteazlarla karşılaştırıldığında en önemlisidir. Bakteriler arasında *Bacillus* türleri spesifik ekstraselüler proteaz üreticileridir. Bu proteazların farmasötik, deri, çamaşırhane, gıda ve atık işleme endüstrilerinde yaygın uygulamaları bulunmaktadır. Nötral ve alkalın proteazlar başta olmak üzere pek çok ticari proteaz *Bacillus* cinsi tarafından üretilmektedir.

Fizyolojideki önemlerinden başka proteazlar teknik enzim uygulamalarında çok yararlıdır. 1913'de Roehm tarafından proteazları endüstride kullanma fikri (özellikle deterjanlarda) pankreatik ekstrakt kullanımına kadar eskiye uzanmaktadır. 1960'da bakterilerden enzim elde edilebilirliği, enzimlerin kullanımını ekonomik olmasının yanı sıra teknik olarak da verimli kıldı. Başlangıçta bu enzimler *B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* gibi *Bacillus* türleri kullanılarak üretilmiştir. Günümüzde dünya çapında, deterjanlarda yaklaşık 15 farklı enzim molekülü kullanılmaktadır. Bu enzimler *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. lentus*, *B. alkaloophilus* ve *B. halodurans* türlerinden elde edilmektedir [140].

Farklı etlerden izole ettiğimiz mezofilik *Bacillus*'ların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi üzerine yaptığımız çalışmada, toplam 279 *Bacillus* suşu izole edilmiştir. Bunların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesinde SMA (Skim Milk Agar) besiyeri kullanılmıştır. İğne öze ile ekim yapılarak 24 saat 37 °C'de bir gün plaklar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda üremenin olduğu bölgedeki zon çapları incelenmiştir ve tespit edilen zon çapları mm cinsinden ölçülmüştür.

Araştırmamızın sonucunda 279 izolattan 168 izolatin proteolitik aktivitesi pozitif bulunurken 111 izolatta hiçbir proteolitik aktivite gözlenmemiştir. Enzim aktivitesi pozitif olan *Bacillus* izolatlarının 145'inde kuvvetli, 12'sinde orta ve 11'inde zayıf proteolitik aktivite tespit edilmiştir.

Proteolitik aktivite belirlenmesi üzerine yaptığımız çalışmada en yüksek proteolitik aktiviteyi gösteren *Bacillus* türlerini *B. lentus*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, ve *B. mycoides* olduğunu tespit ettik. En yüksek zon çapı ise *B. lentus*'da 18mm, *B. firmus*'da 18 mm, *B. licheniformis*'de 18 mm, *B. megaterium*'da 16 mm proteolitik zon çapı ölçülmüştür. *B. sphaericus*'da hiç proteolitik aktivite gözlenmez iken *B. circulans* izolatlarının büyük bir bölümünde proteolitik aktivitenin olmadığı, yani proteaz enzimine sahip olmadıklarını belirledik.

Nijerya'da Olajuyigbe ve Ajele tarafından (2005) *Bacillus* türlerinden ekstraselüler proteaz üretimi üzerine bir çalışma yapılmıştır. İzolasyonlar Ikogosi kaplıcasından yapılmıştır. *Bacillus*'ların proteaz üretim dinamiği 35-65 °C üreme ısısı aralığında, çeşitli pH ve sıcaklıklarda analiz edilmiştir. İzole edilen 25 bakteri arasında 9'u *Bacillus* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar *B. brevis*, *B. licheniformis* (2 suş), *B. subtilis*, *B. macerans*, *B. mycoides*, *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. cereus* ve *B. megaterium* olarak tanımlanmıştır. Proteolitik aktivite SMA'da zon çapları ölçülerek belirlenmiş ve en yüksek proteolitik aktiviteyi 45 mm zon çapı ile *B. licheniformis* IKBL-17 suşu göstermiş, bunu 43 mm zon çapı ile *B. subtilis* IKBS-10 izlemiştir ve *B. macerans* IKBM-11 suşu ise 39 mm olarak ölçülmüştür. Bu üç *Bacillus* türünün çeşitli pH aralıklarında (pH 5 – 10) proteaz üretimi araştırılmıştır. pH 10'da proteaz üretimi yaklaşık %60 iken maksimum proteaz üretimi pH 8'de gözlenmiştir. 37 – 65 °C' üreme ısısı aralığı ve sergilenen proteaz aktivite esas alınarak proteaz üretimine ısı etkisi araştırılmıştır. Üç *Bacillus* türü 60°C'de yaklaşık %95 oranında maksimum proteaz üretmekte, 65°C'deki proteaz üretimi ise yaklaşık %70'dir [141].

Enzimler doğanın katalizörü olarak kabul edilir. Çoğu enzim bugün biyolojik materyallerden fermentasyonla üretilmektedir. Lipitler dünya biyomasının geniş bir parçasını oluşturmaktadır ve lipolitik enzimler bu suda çözünmez bileşiklerin yıkımında önemli rol oynar. Lipazların varlığı 1901'de *B. prodigiosus*, *B. pyocyaneus* ve *B. fluorescens*'de gözlenmiştir (bugün en iyi çalışılan, lipaz üreten bakterileri olan ve günümüzde sırasıyla *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* olarak adlandırılan bakteriler).

Mikrobiyal lipazlar başlıca, uygulama özelliklerinin çok yönlü olması ve toplu üretiminin kolay olmasından dolayı biyoteknolojide enzimlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Lipazlar yağ ve oleokimyasal endüstride, biyoçözünürlüğü olan polimerlerin üretiminde, tekstil endüstrisinde, deterjan endüstrisinde, gıda işlemlerinde, tat ve kalite artırımında, rasemik karışımlarının çözünürlüğünde, teşhis aracı olarak, fırıncılıkta, pastada, ve peynir tadlandırmada, kozmetikte, çay üretiminde, medikal uygulamalarda, biyosensör olarak, derilerin yağını temizlemede, atık işlemlerinde, petrolün çözündürülmesinde, selüloz ve kağıt endüstrisinde ve biyodizel üretiminde olmak üzere çok geniş uygulama alanı vardır.

Farklı etlerden izole ettiğimiz mezofilik *Bacillus*'ların lipolitik aktivitelerin belirlenmesi için bu çalışmada Tributyrin agar (TA) besiyeri kullanılmıştır. *Bacillus* izolatları bu besiyerine iğne öze ile inoküle edilmiştir. 2-7 gün ve 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonucunda ekim yapılan bölgede üreyen koloninin bittiği bölgeden şeffaf açılma görülen örnekler mm cinsinden ölçüldü. Araştırma sonucunda 279 *Bacillus* suşundan lipaz enzim aktivitesi pozitif olan *Bacillus* sayısı 132, lipaz enzim aktivitesi negatif olan *Bacillus* sayısı ise 147 olarak bulunmuştur. Lipaz enzim aktivitesi pozitif olan *Bacillus* izolatları arasında 104'ünün kuvvetli lipolitik aktivite gösterdiği, 7'sinin orta lipolitik aktivite, 21'inin zayıf lipolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Lipolitik aktivite araştırması sonucunda *Bacillus*'ların en yüksek aktivite gösteren türlerini *B. licheniformis* ve *B. megaterium* olarak tespit ettik. *B. firmus*, *B. lentus* türlerinin bazı izolatlarında da kuvvetli lipolitik aktivite tespit edilmiştir. *B. sphaericus* ve *B. circulans* türlerinin çoğu izolatında ise lipolitik aktivitenin olmadığı sonucuna ulaştık. Yaptığımız zon ölçümlerinde *B. licheniformis* türünde en yüksek zon çapı 18 mm, *B. megaterium* türleri arasında en yüksek zon çapı 16 mm olarak bulunmuştur.

Bacillus izolatları ile yaptığımız proteolitik ve lipolitik enzim aktivitesi çalışmasında *B. licheniformis* ve *B. megaterium* türlerinin kuvvetli proteaz ve lipaz enzimi üreten türler olduğunu, proteaz enzim aktivitesi pozitif olan suşların lipaz

enzim aktivitesinin de pozitif olduğu, yani bu iki *Bacillus* türünün her iki enzime de sahip olduğunu belirledik. *B. lentus* izolatlarında proteolitik aktivitenin lipaz aktivitesinden çok daha fazla olduğu, proteaz enzimi pozitif olan bir izolatın lipaz aktivitesinin pozitif olabilmesinin yanısıra büyük bir kısmının lipaz aktivitesinin negatif olduğu, yine aynı şekilde *B. firmus* türünün proteaz aktivitesinin lipaz aktivitesine göre çok daha iyi olduğunu, proteaz aktivitesi pozitif olan izolatın genellikle lipaz aktivitesinin negatif olduğu, ama her iki enzim aktivitesine de sahip olan izolatların bulunduğunu saptadık.

Proteolitik ve lipolitik aktivite üzerine yaptığımız araştırmada *Bacillus*'ların proteolitik aktivitesi pozitif olan izolat sayısının lipolitik aktivitesi pozitif olan izolat sayısından fazla olduğunu tespit ettik. Bu sonuca göre ve yapılan diğer çalışmalar da da benzer sonuçlar alınmış olup, bu sonuçların da bize *Bacillus*'ların içerisindeki bazı türlerin kuvvetli proteolitik aktiviteye sahip olduğu, yani proteaz enzim üretme yeteneğinde sahip olduklarını, bunun yanısıra bulduğumuz sonuçlara göre birkaç türü dışında (*B. licheniformis* ve *B. megaterium*) *Bacillus* türlerinin lipolitik enzim aktivitesinin proteolitik aktivitelere göre daha zayıf olduğunu söyleyebiliriz.

Yapılan çalışmalarda *Bacillus*'ların çoğu türünün kuvvetli proteaz üreticileri olduğu belirtilmekte ve bu sonuçlar bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Yaptığımız diğer araştırmada uçucu yağların antimikrobiyal etkileri çalışılmıştır. Bu çalışmada halk arasında şifalı bitki olarak bilinen kekik bitkisi seçilmiş, Labiateae familyasına ait olan *Satujera wiedemanniana* endemik türünün uçucu yağı elde edilerek *Bacillus* türleri üzerine antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır.

Çalışmamızda 279 *Bacillus* izolatının proteolitik ve lipolitik enzim aktivite sonuçları incelenmiş ve enzim aktivitesi fazla olan 40 *Bacillus* izolatı seçilerek kekik *Satujera wiedemanniana* bitkisi uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde (Bkz. Çizelge 4.25) *B. megaterium*'da T11(2) (17 ± 3 mm), *B. licheniformis* K6(26)'da $12 \pm 0,0$, *B. licheniformis* K12(1), K11(16) ve T4(2)'de (11 ± 1 mm), *B. lentus* T10(14)'de (10 mm) en fazla inhibisyon zon çapları görülürken

B. cereus Kşb.24(4) izolatında ($3\pm0,5$ mm) en küçük inhibisyon zon çapı tespit edilmiştir.

Çeşitli *Satureja* türleri ile ülkemiz ve yurtdışında yapılan benzer araştırmalar ise şöyledir;

Biavati ve arkadaşları tarafından (2004) Antalya'dan toplanan *Satureja cuneifolia* ve *Thymbra sintenisii* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. En duyarlı mikroorganizmalar mayalar ve *Bacillus licheniformis*, *Clostridium tyrobutyricum* ve *Bifidobacterium dentum* olarak tespit edilmiştir. Test edilen yağlar *Bacillus*, *Brevibacillus* ve *Lactobacillus* cinslerinin çoğu türüne karşı zayıf aktivite göstermiştir. *S. cuneifolia* uçucu yağı *B. licheniformis* ve diğer mikroorganizmalar üzerinde düşük konsantrasyonda (400 ppm) antimikrobiyal etki gösterirken *T. sintenisii* uçucu yağı aynı konsantrasyonda sadece *Bifidobacterium dentum* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Test edilen her iki uçucu yağ *B. licheniformis* dışındaki tüm *Bacillus* türlerine karşı zayıf aktivite göstermiştir. *S. cuneifolia* uçucu yağının herhangi bir konsantrasyonu *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. *T. sintenisii* uçucu yağı ise 600 ppm MIC konsantrasyonunda *B. licheniformis* ve *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterirken *B. cereus* ve *B. thuringiensis* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Bizim araştırmamızda *Satureja wiedemanniana* uçucu yağı *B. licheniformis* K6(26) izolatında $12\pm0,0$ mm, *B. licheniformis* K12(1), K11(16) ve T4(2) izolatlarında 11 ± 1 mm inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. *S. wiedemanniana* uçucu yağı *B. megaterium* ve *B. licheniformis* izolatlarında güçlü antimikrobiyal aktivite gösterirken *B. cereus* izolatında $3\pm0,5$ mm ile en zayıf antimikrobiyal aktivite göstermiştir [115].

Benli ve arkadaşları tarafından (2005) Ankara'da kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan araştırmada sekiz farklı çözgen içinde hazırlanan ekstraktların mikroorganizmalara denenmesi sonucunda test edilen on dört mikroorganizmadan sadece *Bacillus subtilis* üzerinde antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir [109].

Benli ve arkadaşları tarafından (2006) Van bölgesinden elde edilen *Satureja hortensis*'in etil asetat ve metanol ekstratının antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. Bu ekstratlar 10 bakteri ve 4 maya türüne disk difüzyon metoduna göre test edilmiştir. *S. hortensis*'in etil asetat ekstratı *P. aeruginosa* (11mm) ve *B. subtilis*'in (10mm) üremesini etkilerken, diğer mikroorganizmalarda aynı etki gözlenmemiştir. *S. hortensis*'in metanol ekstratı *B. subtilis* (17mm), *E. coli* (10,5mm), *Shigella* (12mm), *S. aureus* (16mm) ve *P. aeruginosa* (11,5mm) bakterilerine inhibisyon etkisi göstermiş, diğer mikroorganizmalara etki etmemiştir. *B. subtilis* ve *S. aureus*, antibiyotiklere duyarlı olduğu gibi *S. hortensis* ekstratlarının bu bakterilere karşı inhibisyon etkisinin olduğu bulunmuştur [142].

Adıgüzel ve arkadaşları tarafından (2007) Artvin'den toplanan *Satureja hortensis* uçucu yağlarının gıda zehirlenmesine yol açan bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. *S. hortensis* uçucu yağlarına duyarlı olan bakteri türlerinin maksimum inhibisyon zon çapı 10-38 mm, MIC değeri 15,62–250 µl/ml arasında bulunmuştur. *S. hortensis* uçucu yağları *Bacillus macerans* A199'da 18 mm inhibisyon zon çapı, MIC değeri 62,5 µl/ml, *Bacillus subtilis* ATCC-6633'de antimikrobiyal aktivite gözlenmezken, *B. subtilis* A57'de 10 mm inhibisyon zon çapı, MIC değeri 250 µl/ml, *B. megaterium* A59'da 24 mm inhibisyon zon çapı, MIC değeri 62,5 µl/ml olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda *S. wiedemanniana* uçucu yağı *B. megaterium* T11(2) izolatında 17±3 mm en büyük inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Bu sonuca göre *B. megaterium* izolatlarının *S. wiedemanniana* uçucu yağına genelde daha duyarlı olduğunu tespit ettik [114].

Bezic ve arkadaşlarının Hırvatistan'da (2005) *Satureja montana* ve *Satureja cuneifolia*'nın çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkisi araştırılmıştır. *E. coli*'nin *S. montana* uçucu yağına antimikrobiyal etkisi en büyük inhibisyon zon çapıyla (23-32 mm), bunu 21-28 mm inhibisyon zon çapıyla *Candida albicans* izlemiştir. Methicillin'e dirençli olan *Staphylococcus aureus* (MRSA) 19-25 mm olarak tespit edilirken, *B. subtilis*'de 22-23 mm inhibisyon zon çapı bulunmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* zayıf inhibisyon zon çapı (4-7 mm) gösterirken, *S. cuneifolia* uçucu yağı *B. subtilis* gibi önemli patojenin büyümesini 14-16 mm inhibisyon zon çapıyla

engellediği bulunmuştur. Methicillin'e dirençli olan *S. aureus* (MRSA) 13-17 mm, *E. coli* 7-11mm zayıf inhibisyon zon çapı göstermiş, test edilen mikroorganizmalar arasında *Enterococcus faecium* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin *S. cuneifolia* uçucu yağına dirençli olduğu bulunmuştur [143].

Bacillus'ların hijyenik olmayan çeşitli çiğ et ve et ürünlerinde, süt, baharat vb. gıdalarda bulunması ve uygun sıcaklıklarda üremesi sonucunda, hem toksinleri ve hem de sahip oldukları proteaz ve lipaz enzimleri ile protein ve lipitleri parçalayarak gıdalarda bozulmalara ve ciddi gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır. Bu nedenle yaptığımız çalışmada kekik bitkisinin *B. cereus* ve *B. licheniformis* gibi gıdalarda bozulmalara ve gıda zehirlenmesine yol açan bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki göstermesi, bize uçucu yağ içeren bitkilerin gıdalarda koruyucu amaçlı olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Türkiye'de hayvansal ürünlerin üretim, işleme, transport ve pazarlanması aşamasındaki sanitasyon koşulları dikkate alındığında, yapılan işlemlerin yeterli olmadığı görülmektedir. Özellikle et ürünlerinin üretilmeleri sırasında kullanılan satır, bıçak ve tezgahların hijyenik durumu ile etin çekilmesi, karıştırılması sırasında makina ve eller ile patojen ve saprofit mikroorganizmaların bulaşma tehlikesi vardır. Bu durum halk sağlığı açısından risk teşkil etmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada incelediğimiz çiğ et örneklerinin yüksek sıklıkta *Bacillus* türleri ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen *Bacillus* türlerinin büyük bir kısmının proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durumun etlerde ürün ve kalite kayıplarına neden olduğu bilinmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gökmen M., “Van ilinde tüketime sunulan kıymaların bazı patojen bakteriler yönünden incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Van, 1-25 (2003).
2. Öztan, A., “ Et Bilimi ve Teknolojisi”, *Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, Ankara, 1-11 (1995).
3. Kalaylı, E., Beyatlı, Y., “*Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA’ları”, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(12) : 24-35 (2003).
4. Logan, N. A., Turnbull, P.C.B., “*Bacillus* and recently derived genera”, In:Murray, P.R., Baron E.J., P. faller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H.(eds). *Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology*, Washington, 357 (1999).
5. Quinn, C.P., Turnbull, P., Anthrax In: “Topley-Wilson’s Microbiology and Microbial Infections”, Bacterial Infections, 3, Collier, L. H., Balovas, A., Sussman, M.,(eds). *Edward Arnold*, London, 799 (1998).
6. İnternet : Türk Tabipleri Birliği, “Ankara’da Satılan Sütlerin Değerlendirilmesi” www.ttb.org/STED/sted0202/sut.pdf = (2002).
7. Metin, M. “Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi”, *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, İzmir, 632-654 (1998).
8. İnternet : Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, “Todar’s Online Textbook of Bacteriology”, www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html =(2006).
9. Bilgehan, H. “Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları”, Klinik Mikrobiyoloji, *Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları*, İzmir, 487 (1990).
10. Ayhan, K. “Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar “, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, *Sim Matbaacılık Ltd.*, Ankara, 43- 44 (2000).

11. Pichhardt, K., "Gıda Mikrobiyolojisi", Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar", *Literatür Yayınları*, Manisa, 176-178 (2004).
12. Dixon, T.C., Meselson, M., Guillemin, J., Hanna, P.C., " Anthrax", *N. Eng. J. Med.*, 341: 815 (1999).
13. Turnbull, P., Kramer, J., Melling, J., "Bacillus", Topley-Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, In Parker, M.T., Collier, L.H., (eds), *Arnold*, London, 2: 188 (1990).
14. Hambleton, P., Turnbull, P., "Anthrax vaccine development: A continuing story", *Alan R. Liss, Inc*, 105 (1990).
15. Doğanay, M., Aydın, N., " Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*", *Scand J. Infect. Dis.*, 23: 333 (1991).
16. Lightfoot, N.F., Scot, R.C.D., Turnbull, P.C.B., "Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*", *Salisbury Med. Bull.*, 68: 95 (1990).
17. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Jr. Winn, W.C., "*Bacillus* Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 4th ed.", *J.B. Lippincott Company*, Philadelphia, 469-478 (1992).
18. Bilgehan, H., "Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları", Klinik Mikrobiyoloji, *Bilgehan Basımevi*, İzmir, 317-331 (1986).
19. Tekinşen, O.C. Yurtseri, A., "Ankara'da satılan hazır kıymaların bakteriyolojik kalitesi", *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 27 (1-2): 45-62 (1980).
20. Berkeley, R.C.W., Logan, N., "*Bacillus, Alicyclobacillus* and *Paenibacillus*", Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Emmerson AM, Hawkey PM, Gillespie SH(eds), *Chichester*, Wiley, 185 (1997).
21. Brachman, P. S., "Anthrax", Bacterial Infections of Humans, Epidemiology and Control, Evans A S, Brachman P S (eds), *Plenum Medical*, New York, 75 (1991).
22. Velimirovic, "B. anthrax in Europe", *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 3: 527 (1984).
23. Pugh, A. O., Davies, J. C. A., "Human anthrax in Zimbabwe", *Salisbury Med Bull*, 68: 32 (1990).

24. Kaya, A., Taşyaran, M.A., Özkurt, Z., Yılmaz, S., “Şarbon: 68 olgunun değerlendirilmesi”, *Flora*, 2: 51 (1997).
25. Doğanay, M., “Human anthrax in Turkey”, *Salisbury Med. Bull.*, 87: 8 (1995).
26. Doganay, M., Almaç, A., Hanagasi, R..” Primary throat anthrax: a report of six cases”, *Scand. J. Infect. Dis.*, 18: 415 (1986).
27. Yorgancıgil, B., Sevük, E., Aydemir, M., Demirci, M., Doganay, M., “Anthrax meningitis”, *Tr. J. Med. Sci.*, 28: 457 (1998).
28. Felek, S., Akbulut, A., Kalkan, A., “A case of anthrax sepsis : non-fatal course”, *J. Infection*, 38: 201 (1999).
29. Granum, P.E., Lund, T., “*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins”, *FEMS Microbiol Lett.*, 157: 223 (1997).
30. Kaleli, D., Özkaya, F., “*Bacillus cereus*”, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Sim Matbaacılık Ltd.*, Ankara, 395-401 (2000).
31. Doğanay, M., Bakıcı, M.Z., “*Bacillus cereus*’a bağlı toplu besin zehirlenmesi” *Mikrobiol. Bült.*, 19: 235 (1985).
32. İnternet : Center For Food Safety and Applied Nutrition, “U.S. Food & Drug Administration”, <http://www.vm.cfsan.fda.gov> =(2004).
33. Nickerson and Sinskey, A.J., “Microbiology of Foods and Food Processing”, *American Elsevier Publishing Company*, New York, 306 (1974).
34. Mahler, H., Pasi, A., Kromer, J. M., “Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*” *New Engl. J. Med.*, 336: 1142 (1997).
35. Roy, M., Chen, J.C., Miller, M., Boyaner, D., Kasner, O., Edelstein, E., “Epidemic *Bacillus* endophthalmitis after cataract surgery I: acute presentation and outcome”, *Ophthalmology*, 104: 1768 (1997).
36. Samples, J.R., Buettner, H., “Ocular infection caused by a biological insecticide” *J.Infect. Dis.*, 148: 614 (1983).

37. Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Sani, R., “Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterisation as a laundry detergent additive”, *Process Biochem.*, 35: 213–219 (1999).
38. Steen, M.K., Bruno-Murtha, L.A., Chaux, G., Lazar, H., Bernard, S., Sulis, C., “*Bacillus cereus* endocarditis: Report a case and review”, *Clin. Infect. Dis.*, 14: 945 (1992).
39. Tomic, V., Kern, I., “*Bacillus cereus* pneumonia with empyema”, *Clin Microbiol. Infect.*, 5: 713 (1999).
40. Damgaard, P.H., Granum, P.E., Bresciani, J., Torregrossa, M.V., Eilenberg, J., Valentino, L., “Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds”, *FEMS Immunol. Med. Mic.*, 18: 47 (1997).
41. Cousin, M.A., “Presence of activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review”, *J. Food Protect.*, 45 (2): 172-207 (1982).
42. Stead, D., “Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk”, *J. Dairy Res.*, 54: 535-543 (1987).
43. Banik, R.M., Prakash, M., “Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*”, *Microbiol. Res.*, 159: 135–140 (2004).
44. Cowan, D., “Industrial enzyme technology”, *Trends Biotechnol.*, 14: 177–178 (1996).
45. Kumar, C.G., Takagi, H., “Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint”, *Biotechnol. Adv.*, 17: 561-594 (1999).
46. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., “Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications”, *Appl. Microbiol. Biot.*, 59: 13–32 (2002).
47. Priest, F.G., “Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*”, *Bacteriol. Rev.*, 41: 711-753 (1977).
48. Durham, D.R., Steward D. B., Stellwag, E. J., “Novel alkaline and heat-stable serine protease from alkalophilic *Bacillus* sp. Strain GX6638”, *J. Bacteriol.*, 169: 2762-2768 (1987).

49. Moon, S.H., Parulekar, S.J., "Some observations on protease production in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*", **Biotechnol. Bioeng.**, 41: 43-54 (1993).
50. Frazier, W.C., Westhoff, D.C., "Food Mikrobiology, 4th ed.", **McGraw-Hill Book Co.**, Singapore, 289-397 (1988).
51. Keay, L., Moseley, M., Anderson, R., O'connor, R., Wild, B., "Production and Isolation of Microbiological Proteases", **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, Missouri, USA, 3: 63-92 (1972).
52. Kalisz, H.M., "Microbial Proteinases", Fiechter, A. (Ed.), **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Springer, Berlin, 36: 1-65 (1988).
53. Outtrup, H., Boyee Col. "Microbial Proteases and Biotechnology", Microbial Enzymes and Biotechnology, In: Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (Eds.), **Elsevier Science**, New York, 227-254 (1990).
54. Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Sani, R., "Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterisation as a laundry detergent additive", **Process Biochem.**, 35: 213-219 (1999).
55. Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., "Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1", **Process Biochem.**, 36: 781-785 (2001).
56. Dhandapani, R., Vijayaragvan, R., "Production of thermophilic, extracellular alkaline protease by *B. stearothermophilus* AP-4", **World J. Microb. Biot.**, 10: 33-35 (1994).
57. İnal, T., "Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi", İstanbul, 34-50 (1990).
58. Lechevalier, L., "Handbook of Microbiology", **CRC Press. Inc.**, 593 (1973).
59. Godfrey, T., Reichelt, J., "Industrial Enzymology", The Application of Enzymes in Industry, **Nature Press**, New York, 582 (1983).
60. Metin, M., "Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi", **Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları**, İzmir, 632-654 (1998).
61. Ayhan, K. "Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları" Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını., **Sim Matbaacılık Ltd.**, Ankara, 43- 44 (2000).

62. Rappaport, H.P., Riggsby, W.S., Holden, D.A., "Production, purification and characterization of a proteinase from a transformable strain of *Bacillus subtilis*", *J. Biol. Chem.*, 240: 79-87 (1965).
63. Çelikkol, E., "*Bacillus cereus*'da proteinaz salgılanma dönemleri", *Mikrobiyoloji Bülteni*, 7: 119-125 (1973).
64. Halpern, M.G., "Industrial Enzymes for microbial sources", *Recent Advances, Noyes Data Corporation*, 50-74 (1981).
65. James, W., Mandelstam, J., "Protease production during sporulation of germination mutants of *Bacillus subtilis* and the cloning of a functional gene.", *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 131: 2421-2430 (1985).
66. Postemsky, C.J., Dignam, S.S., Setlow, P., "Isolation and characterization of mutants of *Bacillus megaterium* having decreased levels of spore protease", *J. Bacteriol.*, 135: 841-850 (1978).
67. Hackett, R.H., Setlow, "Enzymatic activity of precursors of *Bacillus megaterium* spore protease", *J. Bacteriol.*, 153: 357-358 (1983).
68. Atalo, K., Gashe, B.A., "Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A) which degrades various kinds of fibrous proteins", *Biotechnol Lett*, 15 (11): 1151-1156 (1993).
69. Jaeger, K.E., Eggert, T., "Lipases for biotechnology", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13 (4): 7-390 (2002).
70. Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S., "Purification strategies for microbial lipases", *J. Microbiol. Meth.*, 52: 1-18 (2003).
71. Tükel, Ç., Çakır, İ., Doğan, H.B., "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2.Bas.", *Sim Matbaacılık Ltd. Şti.*, Ankara, 473-475 (2000).
72. Kalogridou, V.D., "Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk", *J. Dairy Sci.*, 75 (10): 2681-2686 (1992).
73. Driessen, F.M., and Stadhouders, J., "The lipolytic enzymes&co-factors responsible for spontaneous rancidity in cow's milk", *Doc. Int. Dairy Fed.*, 86: 73-79 (1975).

74. Vlaemynck, G., "Study of lipolytic activity of the lipoprotein lipase in lunch cheese of the gouda type", *Milchwiss.*, 47: 164-166 (1992).
75. Sing, A., Srinivason, R.A., Dudani, A.T., "Activity of microbial lipases at low temperatures", *Indian J. Dairy Sci.*, 29: 61-63 (1976).
76. Kalogridou, V.D., "Lipolytic activity and heat resistance of extracellular lipases of some gram-negative bacteria", *Milchwiss.*, 39: 601-603 (1984).
77. Needs, E.C., Anderson, M., Paye, S.J., and Ridout, E.A., "Influence of processing temperature and seasonal change in diet on lipase activity and lipolysis during the mechanical separation of bovine milk", *J. Dairy Sci.*, 52: 255-256 (1985).
78. Dring, R., and Fox, P.F., "Purification and characterization of a heat-stable lipase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 29", *Irish J. Food Sci. Technol.*, 7: 157-171 (1983).
79. Halkman, A.K., Doğan, H.B., Noveir, M.R., "Gıda maddelerinde *Salmonella* ile *E. coli* arama ve sayılma yöntemlerinin karşılaştırılması" Gıda Teknolojisi Derneği, *Armoni Matbaacılık*, İstanbul, 93 (1994).
80. Tunail, N., "Mikrobiyal enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar", Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü*, Ankara, 59-86 (1999).
81. Halkman, A.K., Doğan, H.B., Çakır, İ., Kral, N., İnan, T.T.ü Coşansu, S., Gürsu, G., "Gıdalarda Fekal Koliform Aranması" *Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu 97111201 nolu proje*, Ankara, 8-28 (1997).
82. Taremi, M., Dallal, M.M.S., Gachkar, L., MoezArdlan, S., Zolfagharian, K., Zali, M.R., "Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran", *Int. J. Food Microbiol.*, 17: 321-325 (2006).
83. Doyle, M.P., "Foodborn Pathogens", *Marcel Dekker Inc.*, New York, 787-790 (1989).
84. Frazier, F.C., Westthoff, D. C., "Food Microbiology 4th ed", *Mc Graw-Hill Book Company*, Princenton, 539 (1988).
85. Padhye, N.V., Doyle, M.P., "*E. coli* O157.H7 epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food", *J. Food Protect.*, 55 (7): 555-565 (1992).

86. Gonul, A.Ş., Karapınar, M., “*E. coli*: Patojenitesi ve gıdalardaki önemi”, **Tr. J. Biology.**, 24: 47-60 (1994).
87. Gonzalez A.G.V., Rosa, A.C.P., Andrade, J.R.C., Tibana, A., “Enteropathogenity markers in *E. coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janerio, Brazil”, **Food Microbiol.**, 17: 321-328 (2000).
88. Gültekin, A., Gökalp, A., Bakıcı, M.Z., Oğuz, A., Sağnak, G., “Sivas yöresinde hastalık etkenleri”, **İnfeksiyon Derg.**, 1: 239-246 (1987).
89. Öztürk, R., Midilli, K., Okyay, K., Eroğlu, C., Aygün, G., Kenani, Y., Sarsan, A., “Çocuk ve erişkin yaş grubu sürgün olgularında *Campylobacter jejuni* sıklığının araştırılması”, **Türk Mikrobiol. Cem. Der.**, 24: 42-45 (1994).
90. Ashkenazi, S., Cleary, T.G., “*Campylobacter*”, Nelson Textbook of Pediatrics. 15 nd ed., **Saunders Company**, Philadelphia, 721-724 (1996).
91. Notario, R., Morales, E., Carmalengo, E., Borda, N., Binztein, N., Depertis, A., “Enteropathogenic microorganisms in children with acute diarrhea in 2 hospitals of Rosario, Argentina”, **Medicina (B Aires)**, 53 (4): 289-299 (1993).
92. Gürgün, V., Halkman, A.K., “Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri”, **Son Matbaacılık**, Ankara, 146 (1988).
93. Alkış, N., “Gıda mikrobiyolojisi”, **Yeni İnci Matbaacılık**, Ankara, 174-179 (1982).
94. Edberg, S.C., Ailen, M.J., Smith, D.B., Kriz, N.J., “Enumeration of total coliforms and *E. coli* from source water by the defined substrat technology”, **Appl. Environ. Microb.**, 56 (2): 366-369 (1990).
95. Bilgehan, H., “Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları”, **Bilgehan Basımevi**, İzmir, 45-52 (1996).
96. Claus, D., Berkeley, R.C.W., “Enterobacteriaceae”, **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**, **Sans Tache**, Baltimore, 2 (1996).
97. Levinson, W., Jawetz, E., “Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji”, **Precence Hail**, Washington, 87 (1997).

98. Hofstra, H., Veld, J., "Methods for the detection and isolation of *E. coli* including pathogenic strains", **J. Appl. Bac. System.**, 2: 197-212 (1988).
99. Temiz, A., "Gıdalarda İndikatör Mikroorganizmalar", **Gıda Mikrobiyolojisi**, 18: 87-107 (1998).
100. Feng, P.C., Hartman P.A., "Flourogenic assays for immediate confirmation of *E. coli*", **Appl. Environ. Microb.**, 43 (6): 1320-1329 (1982).
101. Cakır, I., "Koliform grup bakteriler ve *E. coli*", Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, **Armoni Matbaacılık**, Ankara, 296 (1999).
102. Noveir, M.R., "Gıda maddelerinde koliform grup bakteri aranması üzerine karşılaştırmalı bir araştırma", Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 30-35 (1993).
103. Costilow, R.N., "Manual of methods for general bacteriology, **American Society for Microbiology**, Washington, 524 (1981).
104. O'ttoole, D.K., Minda, M.P. "The use of MUG supplement to detect *E. coli* by the multible tube method in marine waters of Hong Kong", **Marine Pollution Bulletin**, 38 (10): 921-924 (1990).
105. Bredie, W.L.P., Boer, E. de, "Evaluation of the MPN, Anderson-Braid-Parker, Petriflim *E. coli*, and Flourocult ECD method for enumeration of *E. coli* in foods of animal origin", **Int. J. Food Microbiol.**, 16: 197-208 (1992).
106. Cakır, I, Dogan, H.B., Halkman, A.K., Worobo, R.W., "An alternative approach for enumeration of *E. coli* in foods", **Int. J. Food Microbiol.**, 68: 217-223 (2001).
107. Tümen G., Kırimer N., Ermin N. and Başer K. H. C., "The essential oils of two new *Satureja* species for Turkey, *S. pilosa* and *S. icarica*", **J. Essent. Oil Res.**, 10: 524-526 (1998).
108. Tümen G. and Başer K. H. C., "The essential oil of *Satureja spicigera* Boiss. from Turkey", **J. Essent. Oil Res.**, 8: 57-58 (1996).
109. Benli, M., Yiğit, N., "Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi", **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 8 (3): 1-8 (2005).
110. Cormican M., D., Pfaller M. A., "Standardization of antifungal susceptibilitytesting", **J. Antimicrob. Chemot.**, 38: 561-578 (1996).

111. Kan, Y., Uçan, U., S., Kartal, M., Altun, M., L., Aslan, S., Sayar, E., Ceyhan, T., “GC-MS analysis and antibacterial activity of cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. essential oil”, ***Turk J. Chem.***, 30: 253 – 259 (2006).
112. Gören, A., C., Topçu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Wilkinson, J., M., Cavanagh, H., M., A., “Analysis of essential oil of *Satureja thymbra* by hydrodistillation, thermal desorber, and headspace GC/MS techniques and its antimicrobial activity”, ***Nat. Prod. Res.***, 18 (2): 189–195 (2004).
113. Azaz, D., Demirci, F., Satıl, F., Kürkçüoğlu, M., Başer, K., H., C., “Antimicrobial activity of some *Satureja* essential oils”, ***Verlag. der. Zeitschrift für. Naturforschung***, 57: 817-821 (2002).
114. Adıgüzel, A., Özer, H., Kılıç, H., Çetin, B., “Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi”, ***Czech J. Food Sci.***, 25 (2): 81–89 (2007).
115. Biavati, B., Özcan, M., Piccaglia, R., “Composition and antimicrobial properties of *Satureja cuneifolia* Ten. and *Thymbra sintenisii* Bornm. et Aznav. subsp. *isaurica* P.H. Davis essential oils”, ***Ann. Microbiol.***, 54 (4): 393-401 (2004).
116. Arık, M., T., “Çiğ süt ve pastörize sütlerden mezofilik, termofilik, psikrotrofik *Bacillus* türlerinin izolasyonları ve bu türlerin proteaz, lipaz, lesitinaz (fosfolipaz C) enzim aktivitelerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 47-49 (2002).
117. Turnbull, P.C.B., Kramer, J.M., “*Bacillus*”, Manual of clinical Microbiology, 5th ed., Ed. Ballows, A., Hauster, J.R., Herman, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., ***American Society for Microbiology.***, Washington D.C., 296-303 (1991).
118. Özdoğan, H., arşivinden (2007).
119. Chopra, A.K., Mathur, D.K., “ Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products”, ***J. Appl. Bacteriol.***, 57: 263-271 (1984).
120. Mostert, J.F., Luck, H., Husmann, R.A., “ Isolation, identification and practica properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk”, ***Animal and Dairy Science Research Institute***, 11(3): 125-131 (1979).

121. A.K. Halkman., “Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları”, **Başak Matbaacılık Ltd. Şti.**, Ankara, 1: 349-351 (2005).
122. Altundağ, Ş., “Labiatae familyasına ait bazı endemik türlerin önemli bitki patojeni bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 85 (2007).
123. Başkaya R., Karaca, T., Sevinç, İ., “İstanbul’da satışa sunulan hazır kıymaların histolojik, mikrobiyolojik ve serolojik kalitesi”, **YYÜ Vet. Fak. Derg.**, 15 (1-2): 41-46 (2004).
124. Farber, J.M., Sanders, G.W., Johnston, M.A., “A survey of various foods for the presence of *Listeria species*”, **J. Food Protect.**, 52 (7): 456-458 (1989).
125. Güven, K., Mutlu, M.B., Avcı, Ö., “Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey ” **J. Food Safety**, 26: 30–40 (2006).
126. Gökmen, M., Alişarlı, M., “Van ilinde tüketime sunulan kıymaların bazı patojen bakteriler yönünden incelenmesi”, **YYÜ. Vet. Fak. Derg.**, 14 (1): 27-34 (2003).
127. Elmalı, M., Yaman, H., “Microbiological quality of raw meat balls produced and sold in the eastern of Turkey”, **Pakistan Journal of Nutrition**, 4 (4): 197-201 (2005).
128. Uzeh, R.E., Ohenhen, R.E., Adeniji, O.O., “Bacterial contamination of tsire-suya, a Nigerian meat product”, **Pakistan Journal of Nutrition**, 5 (5): 458-460 (2006).
129. Smith, D.P., Berrang, M.E., Feldner, P.W., “Detection of *Bacillus cereus* on selected retail chicken products”, **J. Food Protect.**, 67 (8): 1770-1773 (2004).
130. Nortje, G. L., Vorster, S. M., Greebe, R. P., Steyn, P. L., “Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South African retail meats” **Food Microbiol.**, 16: 213-217 (1999).
131. te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Leijendekkers, S., Rombouts, F.M., “Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands”, **Food Microbiol.**, 13 (1): 53-58 (1996).

132. Petrova, L., "Differentiation in culture of *Bacillus* species isolated from semicanned meat", *Vet Med Nauki.*, 12 (8): 8-82 (1975).
133. Efe, M., Gümüşsoy, K.S., "Ankara garnizonunda tüketime sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik analizi", *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 14 (3): 151-157 (2005).
134. Sağun, E., Sancak, Y.C., Ekici, K., Durmaz, H., "Van'da tüketime sunulan piliç but ve göğüs etlerinin hijyenik kalitesi üzerine bir araştırma" *YYÜ Vet Fak Derg.*, 7: 62-66 (1996).
135. Anar, Ş., Çarlı, T., Şen, A., Eyigör, A., "Bursa'da tüketime sunulan piliç butlarından *S. aureus* ve *E. coli* Tip 1 izolasyonu üzerine bir çalışma", *UÜ Vet. Fak. Derg.*, 2: 135-141 (1992).
136. Kundakçı, A., Yücel, A., Uylaşer, V., Konca, R., Can, S., "Soğuk koşullarda depolanan ve satışa sunulan piliç etlerinin mikroflorası ve kalitesi", *II. Uluslararası Gıda Sempozyumu*, Bursa, 191-200 (1991).
137. Nair, K.K.S., Rao, D.N., Haleem, M.A., "Bacteriological quality of dressed chicken", *Indian Vet. J.*, 67: 55-58 (1990).
138. Gökalg, H.Y., Yetim, H., Kaya, M., "Ticari kuruluşlarda dondurularak muhafaza edilen tavuk etlerinin kokuşma düzeyleri ve bakteriyolojik durumları üzerine bir araştırma" *Et ve Balık Endüstrisi Derg.*, 51: 13-22 (1987).
139. Yurtyeri, A., "Paketlenmiş piliçlerin yüzey mikroflorası üzerinde araştırmalar", *Vet. Hek. Der. Derg.*, 50: 45-63 (1980).
140. Maurer, K.H., "Detergent proteases", *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 330-334 (2004).
141. Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O., "Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species", *Afr. J. Biotechnol.*, 4 (8): 776-779 (2005).
142. Benli, M., Yiğit, N., Kaya, İ., "Antimicrobial activity of various extracts of *Satureja hortensis* L.", *J. Appl. Biol. Sci.*, 1 (1): 25-31 (2007).
143. Bezic, N., Skocibusic, M., Dunkic, V., "Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils", *Acta Bot. Croat.*, 64 (2): 313-322 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZDOĞAN, Hakan
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 10.07.1978 Nevşehir/Ürgüp
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 535 525 82 01
 e-mail : hknozdogan@yahoo.com

Eğitim Derece

Eğitim Birimi

Mezuniyet tarihi

Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2003
Lise	Ürgüp Lisesi	1995

İş Deneyimi Yıl

Yer

Görev

2003	ODTÜ	Stajer
------	------	--------

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Müzik, Bilgisayar, Futbol