ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MADDELERİNDE *SALMONELLA* ARANMASINDA LAKTOZ BROTH ve TAMPONLANMIŞ PEPTONLU SU ile ÖNZENGİNLEŞTİRME SÜRESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Hilal SELAMOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2017

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hilal SELAMOĞLU tarafından hazırlanan **"Gıda Maddelerinde Salmonella Aranmasında Laktoz Broth ve Tamponlanmış Peptonlu Su ile Önzenginleştirme Süresinin Karşılaştırılması"** adlı tez çalışması 11/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. A.Kadir HALKMAN

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. A.Kadir HALKMAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Yeşim SOYER
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

11.07.2017



Hilal SELAMOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GIDA MADDELERİNDE *SALMONELLA* ARANMASINDA LAKTOZ BROTH ve TAMPONLANMIŞ PEPTONLU SU ile ÖNZENGİNLEŞTİRME SÜRESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Hilal SELAMOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Gıdalarda *Salmonella* aranması konusunda BAM ile ISO standartları kısmen farklıdır. İki metot için selektif zenginleştirme aşamasında farklı besiyerleri kullanmaktadır. Dolayısı ile bu standartların sadece önzenginleştirme kısımlarının TPS/ LB kıyaslanması ve önzenginleştirme aşamasında inkübasyon sürelerinin *Salmonella* serotipleri üzerindeki etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, gıdalarda *Salmonella* aranması amacıyla önzenginleştirme aşamasında ISO tarafından önerilen tamponlanmış peptonlu su ile FDA tarafından kimi gıdaların analizi için önerilen laktoz broth, *S.* Enteritidis ATCC 13076 ve *S.* Typhimurium ATCC 13311 olmak üzere iki farklı *Salmonella* serotipi için denenmiştir. Çalışmada refakatçi flora olarak *Escherichia coli* ATCC 10536 suşu kullanılmıştır. Işınlanarak sterilize edilmiş kıyma ve UHT süt, ayrı ayrı olmak üzere *S.* Enteritidis + *E. coli* ve *S.* Typhimurium + *E. coli* ile bulaştırılmış, 37 ^{o}C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyonun 15; 18; 21 ve 24. saatlerinde selektif besiyeri kullanılarak *Salmonella* ile *E. coli* sayımları yapılmış ve aynı zamanda pH ölçülmüştür. Denemelerin 2. aşamasında *Salmonella* serotipleri asetik asit ile zayıflatılmış ve yukarıda belirtilen şekilde devam edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, tamponlanmış peptonlu suda pH stabil kalmış (P >0.05) ancak laktoz brothta pH düşmüştür (P <0.05). pH'nın düşmesi *Salmonella* serotiplerinin tümüyle yok olmasına yetecek kadar olmamıştır ve her koşulda *Salmonella* sayımı gerçekleştirilmiştir. *S.* Typhimurium serotipi özellikle laktoz brothta *S.* Enteritidis serotipine kıyasla daha düşük (P <0.05) sayım sonucu vermiştir. Tüm denemelerde ilerleyen inkübasyon süresine bağlı olarak laktoz brothta pH düşmesi olmakla beraber, bu düşüşün *Salmonella* sayısında önemli bir etkisi olmamıştır (P >0.05).

Temmuz 2017, 42 sayfa
Anahtar kelimeler: *Salmonella*, gıda, tamponlanmış peptonlu su, laktoz broth

ABSTRACT

Master Thesis

COMPARISON of THE LACTOSE BROTH vs. BUFFERED PEPTONE WATER and PRE-ENRICHMENT TIME for *SALMONELLA* in FOODS

Hilal SELAMOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

The BAM and ISO standards are partially different for *Salmonella* detection in foods. This two methods use different media for selective enrichment. Here, we aimed to compare (the BPW / LB) only pre-enrichment parts of these standards and the effect of the incubation times in the pre-enrichment phase on *Salmonella* serotypes.

In this study, in the pre-enrichment phase, buffered peptone water recommended by ISO and lactose broth recommended by the FDA for analysis of some foods were tested for two different *Salmonella* serotypes, *S.* Enteritidis ATCC 13076 and *S.* Typhimurium ATCC 13311. *Escherichia coli* ATCC 10536 strain was used as a cohabitant flora in this study. The irradiated sterilized ground meat and UHT milk were separately infected with *S.* Enteritidis + *E. coli* and *S.* Typhimurium + *E. coli* and left to incubate at 37 °C for 24 hours. At the 15th, 18th, 21st and 24th hours of incubation, *Salmonella* and *E. coli* counts were performed using selective media and the pH was measured at the same time. *Salmonella* serotypes were attenuated with acetic acid in the second phase of the experiments and continued as described above. According to the results of this research, the pH in the buffered peptone water was stable (P> 0.05) but in the lactose broth pH was decreased (P <0.05). The reduction of pH was not enough to completely destroy *Salmonella* serotypes and *Salmonella* counts were performed under all conditions. The *S.* Typhimurium isolate showed a lower (P <0.05) counting result especially in the lactose broth than the *S.* Enteritidis isolate. In all experiments, decreased pH in the lactose broth, depending on the duration of the subsequent incubation, did not have a significant effect on the *Salmonella* counts (P >0.05).

July 2017, 42 pages
Key Words: *Salmonella*, Food, Buffered Peptone Water, Lactose Broth

TEŞEKKÜR

Tez çalışma konusu ve seçiminde, çalışmanın planlanmasında ve değerlendirilmesinde yardım ve eleştirileri ile bana yol gösteren, vaktini esirgemeden bana destek olan, bilimsel tecrübe ve engin bilgisiyle vermiş olduğu katkılarının yanında, insan ilişkilerinde de bana örnek olan değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), anlayışları, destekleri ve dostlukları için Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Haklarını asla ödeyemeyeceğim, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan canım annem, babam ve kardeşime; beni her konuda destekleyen, tez yazım sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sn. Ramazan ATA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Hilal SELAMOĞLU
Ankara, Temmuz 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK…..……i
ÖZET..…….....ii
ABSTRACT…….……..……iii
TEŞEKKÜR…….……..…….....iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ…… ……....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ..…… ……...…viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ……..……..……ix
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMEL ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1 Salmonella 3
2.1.1 Genel Bilgiler 3
2.1.2 Salmonellozis ve dünya genelinde gıda kaynaklı salgınları 4
2.1.3 Salmonella'nın klasik kültürel yöntemle aranması 7
2.1.3.1 Önzenginleştirme 10
2.1.3.2 Selektif zenginleştirme 14
2.1.3.3 Selektif katı besiyerine sürme 15
2.1.3.4 Klasik yöntemle Salmonella identifikasyonu 17
3. MATERYAL ve YÖNTEM 18
3.1 Materyal 18
3.1.1 Mikroorganizmalar 18
3.1.2 Geri alma denemesi materyali 18
3.2 Yöntem 19
3.2.1 Aktif kültür denemesi 19
3.2.1.1 Aktif mikroorganizma kültürlerindeki sayının belirlenmesi 19
3.2.1.2 Aktif kültürle önzenginleştirme denemesi 19
3.2.1.3 Selektif zenginleştirme aşaması 19
3.2.2 Zayıflatılmış kültür denemesi 20
3.2.2.1 Salmonella'nın zayıflatılması 20
3.2.2.2 Zayıflatılmış kültürle önzenginleştirme denemesi 20
3.2.3 İstatistiksel analizler 21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 22
4.1 Aktif Kültür Deneme Sonuçları 22
4.2 Zayıflatılmış Kültür İnoküle Edilmiş Önzenginleştirme Besiyerinden Salmonella Geri Alınma Sonuçları 27
5. SONUÇ 31
KAYNAKLAR 32
EK 1 Araştırmada Kullanılan Besiyerleri 38
ÖZGEÇMİŞ 41

SİMGELER DİZİNİ

a_w	Su Aktivitesi
^oC	Santigrat Derece
H_2S	Hidrojen Sülfür
NaCl	Sodyum Klorür
$Na_2HPO_4.12H_2O$	Disodyum Hidrojen Fosfat Dodekahidrat
K_2HPO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat

Kısaltmalar

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devleti
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
ATCC	American Type Culture Collection
BAM	Bacteriological Analytical Manual
dk	Dakika
E.	*Escherichia*
EFSA	European Food Safety Authority
EMS	En Muhtemel Sayı
FDA	Food and Drug Administration
FSIS	Food Safety and Inspection Service
FVRB	Fluorocult Violet Red Bile
g	gram
ISO	International Standard Organisation
kGy	KiloGray
KOB	Koloni Oluşturan Birim
LB	Laktoz Broth
LBPYEBG	Laktoz Broth Sodium Pyruvate Yeast Extract Brilliant Green
log	logaritma
MID	Minimal Infective Dose
MKTTn	Muller-Kauffmann Tetrathionate-novobiocin

mL	mililitre
mm	milimetre
MRD	Maximum Recovery Diluent
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Power of Hydrogen
RVS	Rappaport Vassiliadis
s	saat
S.	*Salmonella*
SAS	Statistical Analysis Software
spp.	species (plural)
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
TS EN	Türk Standardları Enstitüsü
TSB	Tryptic Soy Broth
UHT	Ultra High Temperature
UPB	Universal Pre-enrichment Broth
USDA	United States Department of Agriculture
VBNC	Viable But Non-Culturable
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate
XLT-4	Xylose Lysine Tergitol-4

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Aktif kültürde kıymada pH değişimi 23
Şekil 4.2 Aktif kültürde sütte pH değişimi 24
Şekil 4.3 Pasif kültürde kıymada pH değişimi.....28
Şekil 4.4 Pasif kültürde sütte pH değişimi.....28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Önzenginleştirme besiyerlerine eklenen aktif kültürlerin gıda örneklerine göre başlangıç sayıları (log KOB /250 mL)..... 22

Çizelge 4.2 Kıyma ve süte aktif halde inoküle edilen *Salmonella* serotiplerinin iki farklı önzenginleştirme besiyerinde önzenginleştirme süresi boyunca mikroorganizma gelişimi (log KOB/ g-mL)..... 26

Çizelge 4.3 *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium'un pH 4.3'te asetik asit ile muamelesi sonrası belirlenen sürelerde alınan sayım sonuçları (log KOB/mL) 27

Çizelge 4.4 Kıyma örneğine zayıflatılmış halde inoküle edilen *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium serotiplerinin iki farklı önzenginleştirme besiyerinde önzenginleştirme süresi boyunca mikroorganizma gelişimi (log KOB/g-mL)..... 29

1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı hastalıklar ve ölümlere yol açması nedeni ile halk sağlığı açısından bugün üzerinde en çok çalışılan patojenlerden biri *Salmonella* spp.'dir. Günümüzde gıdalarda *Salmonella* aranması, genellikle klasik kültürel yöntemlerle yapılmaktadır. Klasik kültürel yöntemler, mikrobiyolojik analizlerin temelidir. Patojenlerin hızlı tespiti için geliştirilen analiz yöntemlerinin geçerliğinin kanıtlanmasında da geleneksel yöntemlerden faydalanılmaktadır.

Gıdalarda *Salmonella* aranmasının ilk aşaması, selektif olmayan önzenginleştirmedir. Bu amaçla çok farklı besiyerleri denenmiş ve önerilmiştir. Uluslararası Standartlar Enstitüsü (International Standard Organisation; ISO) 6579 numaralı standartta "buffered peptone water; tamponlanmış peptonlu su; TPS" önerilirken, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) tarafından yayınlanan Bacteriological Analytical Manual (BAM)'in *Salmonella* aranması amacıyla önerdiği önzenginleştirme besiyerleri farklı gıdalar için farklılık görülmektedir. Bunlar arasında "lactose broth; laktoz broth; LB" dikkat çekmektedir.

Salmonella ve diğer patojenlerin analizinde hızlı yöntemlere özellikle gıda sanayisinde rağbet artmakla birlikte bugün için yasal analiz yöntemi ISO ve FDA gibi uluslararası kuruluşlar tarafından önerilen klasik kültürel yöntemdir.

Salmonella bulaşmış gıdalarda *E. coli* ve diğer koliformların bulunması çok muhtemeldir. TPS bileşiminde, fermente edilebilir şeker yoktur, fosfat tamponlar bulunur ve ortamdaki tüm bakteriler gelişmeleri sırasında karbon ve enerji kaynağı olarak peptonu (kazein) kullanırlar. Oysa LB besiyerinin bileşiminde pepton, et özütü ve laktoz vardır, tampon maddeler yoktur. *Salmonella* laktoz negatif bir bakteridir ve dolayısı ile enerji kaynağı olarak pepton ya da et özütünü kullanmak zorunda iken, refakatçi florada bulunması muhtemel koliformlar kolaylıkla laktozu enerji kaynağı olarak kullanırlar, asitlik artar ve varsa gıdadaki *Salmonella*, bu asitlik artışından olumsuz şekilde etkilenebilir.

Salmonella, gıda kaynaklı ölümlere en fazla neden olan patojen olması nedeniyle gıda mikrobiyolojisini en fazla ilgilendiren bakteridir. Buna bağlı olarak gıdalardaki varlığı doğru bir şekilde analiz edilmeli, özellikle sahte negatif sonuçlardan kaçınılmalıdır. Bu sebeple, tezin temel amacı *Salmonella* aranmasında kullanılan LB besiyerinin sahte negatif sonuçlar verip vermediğinin araştırılmasıdır. Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarında yapılan ön denemeler LB'nin sahte negatif sonuçlara neden olabileceğini göstermiştir.

Özelikle en önemli gıda kaynaklı patojen olan *Salmonella* analizinde modifikasyon amaçlı olarak her yıl on binlerce araştırma makalesi yayınlanıyor olsa da bu tez kapsamında sadece standart analizdeki önzenginleştirme aşaması hakkında kısaca bilgi verilecektir.

2. KURAMSAL TEMEL ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Salmonella

2.1.1 Genel bilgiler

Salmonella, *Enterobacteriaceae* üyesi olup genellikle koliform grup bakteriler tarafından yoğun kontamine olmuş gıdalarda rastlanır (Halkman vd. 1994, Montville ve Mathews 2007). *Salmonella* cinsi; somatik, flagellar ve kapsüler antijen tiplendirmesine dayalı olarak 2500'den fazla serotipden oluşmaktadır (Erol 2007, Torlak 2011).

Salmonella cinsi 2500'den fazla farklı serotip içermesine karşın bunlardan sadece 50 kadarı insanlarda patojenite gösterir. Hastalığa yol açan serotiplerin başında *S. enterica* subspecies *enterica* ser. Enteritidis (*S.* Enteritidis) ve *S. enterica* subspecies *enterica* ser. Typhimurium (*S.* Typhimurium) en önemli olanlardır. Bugün kayıtlara geçmiş şekli gıda kaynaklı hastalık etmenleri arasında en fazla hastalanmaya yol açan patojen *Campylobacter jejuni* iken, *Salmonella* serotipleri en fazla ölüme neden olanlardır (D'aust 1997, Zorba 2010, Halkman 2013).

Salmonella, peritrik flagellaları ile hareketli bakterilerdir. Mutasyona uğradıklarında hareketsiz hale gelebilirler. Kolonileri genellikle 2-4 mm çapında olup, bazıları 1 mm çapında da koloni morfolojisi gösterebilirler (Anonymous 1974).

Salmonella'lar için minimum gelişme su aktivitesi (aw) değeri 0.94 iken optimum 0.99'dur. *Salmonella*'ların gıdalarda ve gıda yüzeylerinde iyi yaşadığı bilinmek ile birlikte kuru ortamda yaşayabilme, bu mikroorganizma için karakteristik bir özelliktir. Düşük su aktiviteli şartlara maruz kalma bu mikroorganizmaların sonradan ısıya karşı dayanımlarını artırabilmektedir (Lake vd. 2002).

Salmonella spp. için gelişme sıcaklık aralığı 5-46 ^{o}C optimum gelişme sıcaklıkları ise 35-37 ^{o}C'dir. 4-11 gibi geniş bir pH aralığında gelişme gösterirlerken en uygun gelişme

pH'sı ise 7.4'tür (Halkman vd. 1994, Aytaç ve Taban 2010). Bu bakteriler asidik stres, düşük su aktivitesi ve yüksek sıcaklık gibi koşullara adapte olarak çeşitli yüzeylerde aylarca canlı kalabilmektedirler (White vd. 2006).

Karbohidratlardan asit veya gaz oluştururlar, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanırlar, H_2S üretirler, lizin ve ornithini kadaverin ve putresine dekarboksile ederler, oksidaz negatif, katalaz pozitiftirler, laktoz, sakkaroz ve üreyi metabolize edemezler. Bazı atipik *Salmonella* biyotipleri ise lizini dekarboksile edemezken, laktoz, sakkaroz ve üreyi kullanabilirler (Vazgeçer ve Temiz 2005).

Salmonella spp.'nin bir yandan halk sağlığı açısından yüksek önemi diğer yandan gıda sanayisinde stok maliyetleri nedeni ile olabildiğince hızlı ve doğru bir şekilde analiz edilmesi gereklidir. Bu amaçla analiz süresini kısaltmayı hedefleyen immunokromatografik analiz yöntemleri yanında genetik esaslı testler ile tanımlama süresi kısaltılmakta ve sonuç daha kesin bir şekilde alınmaktadır. İmmunomanyetik seperasyon ise 1980'li yılların başından beri kullanılmaktadır. Yeni hızlı analiz teknikleri arasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemleri kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır (Ibrahim 1986, Holbrook vd. 1989, Tsai ve Slavik 1991, Myint vd. 2006, Ahmed vd. 2014, Liandris vd. 2014).

2.1.2 Salmonellozis ve dünya genelinde gıda kaynaklı salgınları

Salmonella'ların neden olduğu hastalıklar genel olarak salmonellozis olarak adlandırılmaktadır. Klasik bir gıda enfeksiyonu olan *Salmonella* kaynaklı salmonellozisin gıda mikrobiyolojisindeki yeri ve önemi büyüktür. *Salmonella* enfeksiyonları, insanlarda üç farklı sendroma neden olmaktadır. Bunlardan ilki *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) ve *Salmonella enterica* serovar Paratyphi (S. Paratyphi) A'nın neden olduğu tifo ve paratifo en ciddi olanıdır. İkinci grupta enterik hastalıklar, üçüncü ise salmonellozisin en yaygın tipi olarak bilinen gastroenteritis gıda zehirlenmeleri yer almakta ve zehirlenmeler ölümlerle sonuçlanmaktadır (Halkman vd. 1994, Ekici vd. 2008).

Salmonella enfeksiyonları çapraz kontaminasyonlar nedeniyle hızlı yayılma göstermektedir. Endüstriyel sanitasyon uygulamalarında, biyofilm oluşturma yeteneklerinden kaynaklanan dirençlilik sayesinde, canlılıklarını uzun süre sürdürebilmektedirler. Bu dirençlilik de *Salmonella* kontaminasyonlarının hızlı bir şekilde yayılmasına sebep olmaktadır (Karaca 2011).

İnsan salmonellozis hastalığına % 95'i et, süt, yumurtalar, deniz ürünleri, kümes hayvanları ve hazır gıdalar gibi kontamine ürünlerin tüketimiyle ilişkili olarak yakalanılmaktadır. *Salmonella*; gastroenterit, bakteremi, abdominal ağrı, bulantı, kusma, diyare ve baş ağrısı ile belirti gösteren ve gastroenterite bağlı tifoidal ateşi kapsayan birçok farklı hastalık belirtilerine sebep olabilmektedir (Foley vd. 2007).

Salmonella'lar için minimal enfeksiyon dozu (MID), serotipe bağlı olduğu kadar, kişinin yaşı, direnci gibi diğer faktörlerden de etkilenmektedir. Çocuklarda, yaşlılarda, ağır hastalık geçirmiş, radyoterapi, kemoterapi görmüş kişilerde enfeksiyon dozunun 10^2'ye kadar düştüğü görülmektedir (Ekici vd. 2008).

Salmonella'ların primer kaynağı insan ve hayvanlardır. İnsan, taşıyıcı olarak enfeksiyonların potansiyel kaynağını meydana getirmektedir. Taşıyıcı insan ve hayvanların dışkısı enfeksiyonun yayılmasında önemli rol oynamaktadır (Akkaya ve Alişarlı 2006). *Salmonella*, insanlarda ve hayvanlarda önemli bir gıda kaynaklı patojen olarak kabul edilmiştir (Lee vd. 2014). *Salmonella*'ya en çok rastlanılan gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler yer alır. Hammadde, işleme teknolojisi ve depolama şartları *Salmonella* riskinin artmasına neden olmaktadır (Anonymous 1984, Halkman vd. 1994, Var ve Evliya 1995).

Çeşitli ülkelerde insanlarda meydana gelen salmonellozis olgularının son yıllarda sürekli artış gösterdiği ve özellikle gelişmiş ülkelerde en yaygın zoonozlardan biri olduğu belirtilmektedir (Mutluer 1991, Telli 2006).

S. Typhimurium, *S*. Enteritidis, *S*. Typhi ve *S*. Paratyphi A, B, C'nin insanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarına neden olan serotiplerin % 99'unu oluşturduğu belirtilmektedir (Vazgeçer ve Temiz 2005). Dünya genelinde alınan önlemler ve kontrol uygulamalarına rağmen gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları halk sağlığını tehdit etmeye devam etmektedir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan etkenler arasında *Salmonella* ilk sıralardaki yerini korumakta, binlerce kişinin etkilendiği ve ölümlerle sonuçlanan salgınlara neden olmaktadır. 2011 yılının Ekim ve Kasım döneminde, ABD'de bir market zincirinde büyük bidonlar içerisinde satılan Türk çam fıstıkları, *S*. Enteritidis enfeksiyonu sonucu salgına neden olmuştur. Beş eyalette toplam 43 kişi *S*. Enteritidis ile enfekte olmuştur (www.cdc.gov 2011).

Yüksek su aktivitesi (≥0.98) değerine sahip gıdalarda *Salmonella*'lar sıcaklık uygulamasıyla kolaylıkla yıkımlanabilmektedir. Yağ içeriği yüksek olan düşük su aktiviteli gıda maddelerinde mikroorganizmayı yok etmek için çok daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulmaktadır (Telli 2006). Bazı gıdalarda bulunan yüksek yağ oranı, canlı mikroorganizma varlığının az olmasına rağmen midenin asidik koşullarına karşı *Salmonella*'yı koruyarak canlılığını sürdürmesine yardımcı olur. Düşük nem içerikli gıdalarda *Salmonella* enfeksiyon dozunun çok düşük olduğu rapor edilmiştir (Lehmacher vd. 1995, Zink 2008).

EFSA'nın 2011 raporunda, 2009 yılında 27 Avrupa ülkesinde yapılan araştırmada sağlık yetkililerinin vermiş olduğu bilgilere göre yaklaşık 109 bin insan salmonellozis vakası bildirilmiştir. 2005 yılından itibaren yapılan araştırmalarda 2005-2009 yılları arasında salmonellozis vakalarında % 13 oranında azalma tespit edilmiştir. Tüm bunlar, sağlık yetkililerinin çabaları ve AB üye devletlerinin politikalarının olumlu ve etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Giaccone vd. 2012).

1994 yıllında Yeni Meksika'da (ABD) meydana gelen önemli bir *Salmonella* salgını ise, kurutulmuş sığır etini tüketen 93 kişi *Salmonella* ile enfekte olmuştur. Yakın zamanda gerçekleşen 2012 yılında Minnesota'da kurutulmuş hindi eti tüketen 4 kişide salmonellozis olgusuna rastlanmıştır (Cutter vd. 2014).

FDA 2012 yılında bir çiftlikte yetiştirilen kavunların tüketimine bağlı olarak, ABD'nin 21 farklı bölgesinde 2'si ölümle sonuçlanan vakalarda 62 kişinin *S*. Enteritidis'ten etkilendiğini bildirmiştir. Dünyada *Salmonella*'nın sosyal ve ekonomik açıdan önemi, 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren salgınların sayısındaki artış, bilinenlerin yanında değişik gıdaların neden olduğu vakaların ortaya çıkması ve bunlara ek olarak *Salmonella*'ların antibiyotiklere geliştirdiği direnç sonucu giderek artmıştır (www.ggd.org.tr 2013).

2.1.3 *Salmonella*'nın klasik kültürel yöntemle aranması

Kültürel yöntemler gıdalardaki mikrobiyolojik analizlerin temelidir. Günümüzde *Salmonella* aranması, izolasyonu ve tanımlanması için birçok ülkede klasik kültürel yöntemler kullanılmaktadır (Vazgeçer 2004, Lee vd. 2014).

Gıda endüstrisinde kalite güvencesinin sağlanması ve halk sağlığının korunması açısından mikrobiyolojik risklerin hızlı tespiti son derece önemlidir (Torlak 2011) Gıdada, kalitenin yükseltilebilmesi için öncelikle kalite kriterlerinin doğru bir şekilde belirlenmesi ve var olan kalite ölçümlerinin doğru bir şekilde yapılması gereklidir (Halkman vd. 1994).

Salmonella'nın tespiti için genellikle klasik kültürel yöntemlere başvurulmaktadır. Ancak klasik kültürel yöntem oldukça uzundur ve genel olarak en az 5-7 gün arasında tamamlanmaktadır. Ayrıca klasik kültürel yöntemler çok fazla işlem basamağı içermektedir. Buna karşılık hızlı *Salmonella* belirleme yöntemlerinin geliştirilmesi adına çok yoğun çalışmalar yapılmakta ve zamandan en iyi şekilde tasarruf edilmeye çalışılmaktadır.

Hızlı yöntemler genellikle gıdalardaki bir tek patojenin belirlenmesini hedeflemektedir. Hızlı testler, değişik teknolojilere ve farklı formatlara dayandığı için çoklu gıda matrislerinde, performansları da oldukça farklılık göstermektedir. Ayrıca bu testler incelenen örnekteki hasarlı hücreleri canlandırmak ve hedef mikroorganizmanın sayısını

arttırmak için çoğunlukla kültürel zenginleştirme aşamasına da ihtiyaç duymaktadır (Vazgeçer ve Temiz 2005).

Klasik yöntemlerle hızlı yöntemler kıyaslandığında kuşkusuz hızlı yöntemler kayda değer üstünlük sağlamaktadır ancak farklı gıda matrislerinde gösterdiği duyarlılık, analiz maliyeti, özgünlük gibi çeşitli sebeplerden dolayı hızlı testlerin kullanımında çekinceler vardır. Günümüzde, bir takım üstünlükleri de göz önünde bulundurularak klasik kültürel yöntemler halen daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Ülkemizde de bu amaçla TS EN ISO 6579 "Gıda ve hayvan yemleri-*Salmonella* türlerinin belirlenmesi için yatay yöntemler" standardında da tarif edilen klasik kültürel yöntemden yararlanılmaktadır (Anonim 2005).

Salmonella tespit edilmesinde geleneksel kültürel metodun ilk basamağı önzenginleştirmedir. Bu aşamanın en önemli fonksiyonu, gıdada tespit edilmesi amaçlanan mikroorganizmanın stres altında bulunması durumuna karşı mikroorganizmanın varlığını saptamak için uygulanan bir aşama olmasıdır. Bunu izleyen selektif zenginleştirme aşamasında bakterinin varsa hasarını tam olarak gidermiş ve aktif olarak bulunması istenir. Selektif zenginleştirme besiyerlerinin bileşimi hedef bakteriyi en az, ancak refakatçi florayı en fazla baskılayacak şekilde selektif baskılayıcı maddeler içerir. Refakatçi floranın tümüyle baskılanması söz konusu değildir, izleyen selektif katı besiyerinde bile refakatçi flora kolonilerine rastlanır (Halkman vd. 1994, Ramnani vd. 2010, Juneja vd. 2016).

Zenginleştirme işleminden sonraki aşama; *Salmonella*'yı saf olarak izole edebilmek adına değişik seçici, ayırt edici besiyerleri kullanılır. Selektif katı besiyerinden *Salmonella* şüphesiyle izole edilen bakterinin *Salmonella* olup olmadığı biyokimyasal ve serolojik testler ile doğrulanmalıdır. *Salmonella* analizinde selektif olmayan önzenginleştirme işleminden sonra selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine sürme işlemleri kombine edilerek analiz süresini bir gün kısaltan yarı katı besiyerleri de son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Halkman 2013).

Bu aşamaların uygulanmasında görülen farklılıklar, çeşitli kuruluşlar tarafından farklı besiyerleri, farklı inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları önerilmesinden kaynaklanmaktadır (Halkman vd. 1994).

Farklı tiplerdeki numunelerde bulunan herhangi bir mikroorganizmanın saptanması için tek bir metodun optimal olması mümkün değildir. Birleştirilmiş ve standartlaştırılmış yöntemler, laboratuvarlar arası karşılaştırmanın yapılmasını sağlamak ve belirli bir laboratuvardaki çalışmayı kolaylaştırmak için arzu edilmektedir (Halkman vd. 1994).

Salmonella spp.'nin TS EN ISO 6579/A1'e göre standart analizi 25 g-mL gıda numunesinde var/ yok şeklinde yapılır (Anonim 2010). Bu standarda göre selektif olmayan besiyerinde 18 saat önzenginleştirme, 2 farklı selektif besiyerinde 24 saat süre ile selektif zenginleştirme ve ardından her iki selektif zenginleştirme besiyerinden birisi xylose lysine deoxycholate (XLD) agar olmak kaydı ile 2 farklı selektif katı besiyerine sürme ve 24 saat inkübasyon yapılır. Selektif katı besiyerlerindeki inkübasyon sonunda 4 Petri kutusundan bir adedinden dahi *Salmonella* izole edilirse analiz edilen numunede *Salmonella* var olarak analiz sonuçlandırılır. Agarlı besiyerinde tipik morfolojide *Salmonella* kolonisi görülmesi yeterli değildir. Biyokimyasal testler uygulanarak tanımlama devam eder ve en son olarak polivalan antiserum ile *Salmonella* tanımlaması biter. Standart gıda analizinde serotiplendirmeye gerek duyulmaz ve izolatın patojen olup olmadığı araştırılmaz. Bununla birlikte, hastalanma ve özellikle salgınlarda hangi serotipin etmen olduğu araştırılır.

Her ne kadar standart analizde 25 g-mL'de var/ yok testi yapılırsa da yine hangi serotipin hangi sayıda hastalanma ve salgına neden olduğunun araştırılması için En Muhtemel Sayı esaslı standart analizler de vardır. 2016 yılında gözden geçirilmiş ISO/TS 6579-2:2012 numaralı standarda göre analiz edilecek gıda numunesinden standart şekilde seyreltiler elde edilir ve önzenginleştirmeye bırakılır. Bu aşamadan sonra modifiye edilmiş yarı katı Rappaport Vassiliadis (MSRV) besiyerine ekim yapılarak EMS çizelgesine göre sonuç alınır. Bu şekilde selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine ekim aşamaları birleştirildiği için analiz süresi 1 gün kısalır

ancak bu yöntem, hareketsiz serotipler olan *S*. Gallinarum ve *S*. Pullarum için uygun değildir (www.iso.org 2016a).

Önzenginleştirme

Klasik kültürel yöntemle *Salmonella* belirlenmesi, önzenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif katı besiyerine sürme, biyokimyasal testler ve serolojik doğrulama basamaklarından oluşur (Halkman vd. 1994, Vazgeçer 2004).

Salmonella'nın tespit edilmesinde geleneksel kültürel metodun ilk basamağı önzenginleştirmedir. Bu aşamanın en önemli fonksiyonu, gıdada tespit edilmesi amaçlanan mikroorganizmanın stres altında bulunması durumuna karşı mikroorganizma varlığını saptamak için uygulanan bir aşama olmasıdır (Halkman vd. 1994, www.biotek.com 2014).

Besiyerlerinin kompozisyonu ve kalitesi bu aşamayı etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Analiz edilen gıda çok düşük sayıda *Salmonella* içerebilir. Bu nedenle de besiyerleri ve kullanılan yöntemler, gıdalarda düşük sayıda bulunan *Salmonella* hücrelerini onaracak ve canlandıracak özellik taşımalı ve inhibe etmeyecek niteliğe sahip olmalıdır (Vazgeçer ve Temiz 2005).

Salmonella geri kazanılmasında önzenginleştirme ortamlarının seçimi kadar inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları da önemlidir. Önzenginleştirme aşamasında inkübasyon süresinin kısaltılması stres veya hasarlı hücrelerin onarımına yetmediği için tavsiye edilmemektedir (Halkman vd. 1994, Pignato vd. 1995, Zorba 2010).

Gıdaların soğutulması, dondurulması, kurutulması, asitle muamelesi, koruyucu madde ilavesi, düşük dozda radyasyona maruz bırakılması gibi uygulamalarla gıdadaki mikroorganizmalar strese girer. Stresin boyutu mikroorganizma türüne ve uygulanan stres faktörünün derişimine göre değişir. *Salmonella* çevresel olumsuzluklara karşı sporsuz bir

bakteri olması nedeni ile çok yüksek bir direnç göstermez ve stres altına girer (Doğan vd. 1994, Juneja vd. 2016).

Bu sorundan kurtulmak için patojen analizlerinde bir ya da daha fazla (ardışık) zenginleştirme veya canlandırma işleminden sonra selektif katı besiyerine ekim uygulaması vardır.

Canlandırma, kısa süreli bir selektif olmayan önzenginleştirme olarak da tanımlanabilir. Çok genel olarak 4 saatlik bir uygulamadır. Amaç, hasar görmüş olması muhtemel hedef bakterinin bu hasarını onarması işlemidir. Selektif inhibitörler zenginleştirme besiyerine katılmadan önce 4 saat süre ile optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılan homojenizatta, hedef bakterinin kendisini toparladığı kabul edilir (Reissbrodt vd. 1996, Halkman 2013).

Yukarıda verilen bilgilere göre; selektif olmayan bir besiyerinde ve uygun inkübasyon sıcaklığında 4 saat bekletme "canlandırma", ama yine selektif olmayan bir besiyerinde ve uygun inkübasyon sıcaklığında 16-24 saat süreli inkübasyon "önzenginleştirme" olarak tanımlanmaktadır. Bu ikisi arasındaki fark, bakterinin olumsuz çevresel faktörlere karşı direnci/ duyarlığıdır (Rammani vd. 2010, Hitchinks ve Jinneman 2011).

Dünyanın önde gelen kuruluşlarından biri olan FDA tarafından yayınlanan BAM'nin *Salmonella* aranması amacıyla farklı gıdalarda önzenginleştirme için LB besiyerinde 35 ^{o}C'de 24±2 saat inkübasyon önermekte iken (www.fda.gov 2016b), ISO ise TPS ile 35-37 ^{o}C'de 16 saatten az 20 saatten çok olmamak üzere önzenginleştirme yapılması gerektiğini belirtmektedir (Anonymous 2002).

ISO, 25 g gıda örneğinde *Salmonella* spp. bulunmaması gerektiği için, 25 g gıdanın incelenmesi gerektiğini bildirmiştir. Bu nedenle *Salmonella* belirleme yöntemlerinde gıdanın 25 gramında bulunabilecek bir tek *Salmonella* hücresini belirlemesi gerekmektedir (Telli 2006, Yuk vd. 2014, www.fda.gov 2016b).

Bu aşamada 16-24 saat süre ile selektif olmayan bir ortamda gıda numunesi inkübasyona bırakılır. *Salmonella* aranmasında önzenginleştirme amacıyla ISO'ya göre gıdalarda TPS önerilirken (www.iso.org 2016a), FDA; kurutulmuş yumurta sarısı ve beyazı ve bunları içeren kek, bisküvi, makarna, ekmek benzeri ürünlerde, süt, ayran, peynir mayası, peynir, taze, donmuş ve kurutulmuş sebze ve meyveler, et, et ikameleri, balık gibi çeşitli gıdalarda LB besiyeri kullanılmasını önermektedir (www.fda.gov 2016b).

Bakterinin hassasiyetine, çevresel faktörlerden ve/ veya gıda işlemleri sırasında gördüğü olası zararlara göre selektif olmayan önzenginleştirme ve arkasından selektif zenginleştirme olabileceği gibi doğrudan selektif zenginleştirme de olabilir (Pignato vd. 1995, Halkman 2013, Lee vd. 2014).

Selektif olmayan önzenginleştirmede hiçbir inhibitör olmayan genel sıvı besiyerleri kullanılır. Burada amaç, hedef bakterinin sayısının artırılması değildir. Sadece, selektif olmayan bu ortamda bakterinin "eğer stres altında ise" stres faktörlerinden kurtularak tam anlamı ile uyanması/ kendine gelmesi/ canlanması amaçlanır. Sonraki selektif zenginleştirme aşamasında hedef bakteri sayısının artması amaçlanır. Zenginleştirme aşaması/ aşamaları çok genel olarak 18-24 saat sürer. Selektif olmayan önzenginleştirme aşamasının 24 saat sürmesi koşulunda bir takım sakıncalara aşağıda *Salmonella* analiz örneği konusunda değinilecektir (Vazgeçer 2004, Halkman 2013).

Salmonella analizinde ISO 6579'a göre hiçbir selektif inhibitör içermeyen ve refakatçi floranın olası olumsuz pH değişmelerine karşı tamponlanmış olan önzenginleştirme besiyeri kullanılır (Anonymous 2002). Burada amaç eğer analiz edilen gıdada hasar görmüş *Salmonella* varsa bakterinin hasarı onarmasıdır. Refakatçi floradaki sayı artışı önemsenmez.

LB bileşiminde bulunan laktoz, koliformlar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılır ve sonuçta besiyerinde asitlik giderek artar. Bu asitliğin eğer aktif formda stres altında olmayan *Salmonella* üzerinde bile ve özellikle uzun inkübasyonda olumsuz bir etki yapacağı açıktır (Al-Nabulsi vd. 2014, Burin vd. 2014). Bu durumda izleyen selektif

zenginleştirme aşamasına aktif değil, stres altına girmesi beklenir. Bunun anlamı ise sahte negatif sonuçlardır. Rathnayaka (2011) *Salmonella* analizinde önzenginleştirmenin önemine dikkat çekmiştir.

Salmonella izolasyonunda, besiyerlerinin tipi ve kompozisyonu değiştirilerek *Salmonella* spp. belirlenmesi ile ilgili yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

FDA tarafından, gıda kaynaklı bakteriyel patojen *Salmonella* türü için universal önzenginleştirme broth geliştirilmesi hedeflenen bir çalışmada; önzenginleştirme amacıyla geliştirilmiş iki broth (tampon sistemi içeren *Yersinia pestis* zenginleştirme broth (Ype) ve % 0.25 glikoz içeren modifiye TPS (mTPS)) ve şu anda kullanılan LB ve mTPS yanı sıra Ype gibi sıvı besiyerleri karşılaştırılmıştır. *S.* Typhimurium (4.65±0.89 log KOB/mL) inoküle edilen brothlardan, LB'de en düşük gelişimi gösterirken, tampon sistemi içeren Ype'den anlamlı olarak (P <0.05) daha iyi gelişme göstermiştir. Aynı şekilde *S.* Typhimurium, % 0.25 glikoz içeren mTPS'de, glikoz içermeyen mTPS'den anlamlı olarak (P <0.05) daha iyi gelişme göstermiştir (Hirneisen vd. 2013).

Peyniraltı suyu protein tozunda *Salmonella* tespitinde doğru zenginleştirme protokolünün belirlenmesi, bu geleneksel zor matriste doğru ve güvenilir sonuca ulaşılabilmesi adına yapılan bir çalışmada; numunelerde önzenginleştirme amaçlı kullanılan 42 °C'de universal önzenginleştirme broth (UPB) ve 35 °C'de LB 24 saat inkübasyon sonucunda birbiri ile kıyaslandığında *Salmonella* gelişimini en iyi destekleyen UPB olarak bulunmuştur (Briggs vd. 2013).

TPS genellikle pek çok gıda için kullanılan önzenginleştirme besiyeridir. Ancak buna karşılık yeni önzenginleştirme besiyerleri geliştirilerek klasik kültürel yöntemlerin uygulama süresi kısaltılmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen laktoz broth sodium pyruvate yeast extract brilliant green (LBPYEBG) besiyerinin klasik LB besiyerine göre daha iyi sonuç verdiğine değinilmektedir. LBPYEBG besiyerinde 40 ^{o}C'de 7 saat inkübasyondan sonra direkt selektif katı besiyerlerine ekim yapılmış ve *Salmonella*

izolasyonu ve belirlenmesi için 26±2 saatlik bir sürenin yeterli olduğu belirtilmiştir (Vazgeçer ve Temiz 2005).

Selektif zenginleştirme

Kültür temelli yöntemler halen en yaygın kullanılan saptama teknikleridir ve seçicilikleri ve duyarlılıkları nedeniyle *Salmonella*'nın saptanması için altın standart olmaya devam etmektedir. Örneğin, ABD'de USDA, FDA ve Gıda Güvenliği ve Denetim Hizmeti (FSIS), izole bir organizmayı kontaminasyonun kesin kanıtı olarak göstermektedir (Odumeru ve Leon-Velarde 2012).

Salmonella'nın tespit edilmesindeki ikinci aşama selektif zenginleştirme aşamasıdır. Selektif zenginleştirmenin amacı; gıdada bulunan rekabetçi mikroorganizmalar baskılanırken *Salmonella* izolasyonunu kolaylaştırmak için *Salmonella*'nın sayısını artırmaktır. Bu aşama için çeşitli sıvı besiyerleri önerilmektedir. En yaygın olarak kullanılan besiyerleri ise selenit sistin broth ve tetratiyonat brothtur. İki besiyeri de rekabetçi mikroorganizmaların çoğalmasını sınırlarken, *Salmonella*'nın çoğalmasına izin verir (Halkman vd. 1994).

Selektif zenginleştirme aşamasında FDA ortam olarak yüksek refakatçi flora varlığında Rappaport Vasiliadas Soy (RVS) broth için 42±0.2 ^{o}C'de 24±2 saat inkübasyon, tetratiyonat broth için ise 43±0.2 ^{o}C'de 24±2 saat inkübasyon, gıdada düşük refakatçi varlığında RVS broth için 42±0.2 ^{o}C'de 24±2 saat inkübasyon, tetratiyonat broth ve selenit sistin broth için ise 35±2.0 ^{o}C'de 24±2 saat inkübasyon önermektedir (eurlex.europa.eu 2017). Genel olarak ise AOAC/FDA/BAM bu üç selektif besiyeri için 35±2.0 ^{o}C'de 24±2 saat inkübasyonu uygun görmektedir (www.antimicrobialresistance.dk 2003). ISO (www.antimicrobialresistance.dk 2003, Lee vd. 2014) RVS broth ve tetratiyonat brothta (Muller Kauffman) 42±0.2 ^{o}C'de 18-24 saat inkübasyon önermektedir.

Muller Kaufman tarafından tetratiyonat broth, brillant green ve ox-bile kullanılarak modifiye edilmiştir. Tetratitiyonat brothun etkinliği, *Salmonella*'larda bulunan tetratiyonat redüktaz varlığından ileri gelmektedir. Muller-Kauffman tetratiyonat broth refakatçi mikroorganizmayı inhibe etmesinin yanında *Salmonella* için de toksik etki gösterebilmektedir (Halkman vd. 1994).

Salmonella aranması, özellikle *Enterobacteriaceae*'nın yoğun olduğu örneklerle yapılan çalışmalarda önzenginleştirme olarak tamponlanmış peptonlu su ve selektif zenginleştirme olarak da Muller-Kauffman tetratiyonat broth aşamalarını içermektedir. Kıyma örneği, önzenginleştirme aşamasında nalidiksik aside dirençli üç referans *Salmonella* ile aşılanmıştır. *Salmonella* pozitif testlerde, laktoz negatif *Enterobacteriaceae* sayısı TPS ortamında 10^3-10^7 KOB/mL seviyesine çıkmış ancak ikinci aşama olan tetratiyonat broth besiyerine transferi sonrası *Enterobacteriaceae* sayısı 10^4 KOB/mL seviyesine kadar düştüğü gözlemlenmiştir. *Salmonella* negatif testlerde, *Salmonella* TPS ortamında daha az gelişme göstermiş ve tetratiyonat broth besiyerinde azalma göstermiştir (Halkman vd. 1994).

Önzenginleştirme aşamasında eğer refakatçi flora yoğun olduğu durumda ortam pH'sında azalma gerçekleşiyorsa, bu durumun *Salmonella*'nın gelişimini engellediği görülmüştür. *Salmonella*'nın son sayısı TPS ortamına değil ayrıca tetratiyonat broth besiyerindeki zenginleştirmeye de bağlıdır. Van Schotrost ve Renaud yapmış oldukları çalışmada RVS broth ortamı için generasyon süresini yaklaşık 1 saat olarak hesaplamıştır, ancak tetratiyonat broth için bu sürenin değişken olduğu saptanmıştır (Halkman vd. 1994).

Selektif katı besiyerine sürme

Salmonella aranmasının üçüncü aşaması olan selektif katı besiyerine sürmede uygun katı besiyerinin seçilmesi bakterilerin izolasyonu için oldukça önemlidir.

Gıdalardan *Salmonella* izolasyonu için selektif katı besiyerlerinde safra tuzları ve brillant green gibi selektivite ajanları kullanılmaktadır. Besiyerinde sadece *Salmonella* türleri ve serotipleri değil, gelişimi önlenememiş refakatçi mikroorganizmalar da gelişebilmektedir. *Salmonella*'nın izolasyonu için önzenginleştirme ve selektif zenginleştirme aşamalarında refakatçi floranın inhibisyonu oldukça önemlidir. Bundan dolayı, önzenginleştirme ve selektif zenginleştirme besiyerlerinin bileşimi ortamda olduğu tahmin edilen rekabetçi florayı yok edecek şekilde oluşturulmalıdır (Vazgeçer 2004).

Gerek selektif zenginleştirme sıvı besiyerleri gerek zenginleştirme sonrası kullanılan selektif katı besiyerleri, refakatçi floranın gelişmesini baskılayacak çeşitli inhibitör maddeler içerir. Bu selektif maddeler, hedef mikroorganizmanın gelişmesini minimum düzeyde baskılarken, refakatçi florayı maksimum düzeyde baskılar. Selektif inhibitörden kasıt budur. Bir diğer deyiş ile bu kimyasallar geniş spektrumlu antibiyotik değildir. Besiyerlerindeki derişimleri, hedef bakteriye minimum zarar verecek kadardır. Ancak, eğer hedef bakteri stres altında ise, bu kimyasalların varlığından olumsuz etkilenir ve selektif besiyerinde gelişemez. Sonucun sahte "negatif" olarak alınmasındaki temel nedenlerden birisi budur (Anonim 2005).

Salmonella için geliştirilen selektif besiyerlerinde ana amaç çoğu *Salmonella*'nın laktozu, bazılarının ise sakkoroz ve salisini kullanamamasına dayanır. *Salmonella* için geliştirilen çoğu selektif besiyeri istenilen sonucu vermiş olsa da tam selektivite sağlayamamaktadır (Köse 1993, Halkman vd. 1994).

Selektif katı besiyeri olarak AOAC/ FDA/ BAM bizmut sülfit agar, XLD agar ve hektan enterik agarda 35 ^{o}C'de 24±2 saat inkübasyon; ISO ise brillant green fenol red agar ile kullanıcı tarafından seçilmiş başka bir katı besiyerinde 35 ^{o}C veya 37 ^{o}C'de 24 saat inkübasyon önermektedir (www.antimicrobialresistance.dk 2003).

Katı besiyerinde, enterik patojenlerin tespiti için yaygın olarak safra tuzu kullanımı geniş yer bulmuştur. Gram pozitif bakterilerinin baskılanması için safra tuzları ve saf sodyum deoksiçolat, bazı Gram negatif bakterilerin inhibisyonu için ise sodyum sitrat

ile brilliant green kullanımı çok sık görülmektedir. *Salmonella* izolasyonu için özellikle *Salmonella* Typhimurium'un izolasyonunda bizmut sülfit agar önerilmektedir. *Salmonella* fermente olabilir karbohidrat varlığında geliştiğinde saptanabilir, sülfid demir varlığında ortam siyahlaşınca tespit edilir (Halkman vd. 1994).

Klasik yöntemle *Salmonella* identifikasyonu

Gıda mikrobiyolojisinde izole edilen bir mikroorganizmanın tanımlanması önemlidir. Bir gıda maddesinden izole edilen bakterinin gerçekten *Salmonella* olup olmadığının belirlenmesi için selektif katı besiyerinden elde edilen *Salmonella* kültürlerine biyokimyasal test uygulanarak tanımlamaya başlanır (Anonim 2005).

Tanımlanacak kültürün saf olarak elde edilmesi identifikasyon testlerine geçmeden önceki en önemli kısmıdır. Saf kültür elde edilmesinin, tüm tanımlama testleri öncesinde yapılmış olması oldukça önemlidir.

Salmonella aranmasında biyokimyasal testler konusunda farklı kuruluşlar birbirinden farklı testler önermektedir. AOAC kültürlerin lisin iron agar ve triple sugar iron agarda meydana gelen reaksiyonların tespiti, istenilen sonuç alınamazsa üre testinin yapılmasını önermektedir. Eğer üre testi yapıldığında negatif sonuç alınmış ise, ilave olarak lisin dekarboksilaz broth, fenol red dulsitol broth, tripton broth, potasyum siyanid broth, malonat brothtaki sonuçların incelenmesi ve indol testi yapılması ve sonrasında da serolojik testlere geçmesini önermektedir (Doğan 1993).

ISO, kültürlerin tanımlanması aşamasında; üre agar, triple sugar iron agar, lisin dekarboksilaz brothtaki reaksiyonların gözlemlenmesi, sonuca göre indol testi, β-galaktozidaz testi ve Voges-Proskauer testi uygulanmasını önermektedir. Sonrasında ise serolojik testlerin yapılması gerektiğini belirtmiştir (Anonymous 2002).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Denemelerde gıda numunelerinden geri alma amacıyla kullanılacak olan *S.* Enteritidis ATCC 13076, *S.* Typhimurium ATCC 13311 ve *E. coli* ATCC 10536 suşları Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Bu bakterilerin seçilme amacı, *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium serotiplerinin gıda kaynaklı hastalık ve ölümlerde en yaygın görülen serotipler olmasıdır. Analiz edilecek gıda numunesinde sadece *Salmonella* varsa önzenginleştirme besiyerinin ne olduğu hiç önemli değildir ancak bu araştırmanın temelini oluşturan sorgulama, refakatçi flora varlığı durumunda *Salmonella* serotiplerinin davranışını belirlemektir. Bu amaçla refakatçi florayı temsil etmek amacı ile *E. coli* seçilmiştir.

3.1.2 Geri Alma Denemesi Materyali

Bu çalışmada geri alma denemesi materyali olarak et ve süt olmak üzere iki farklı gıda kullanılmıştır. Denemeler boyunca sadece tarafımızca kullanılan mikroorganizmaların dışında mikroflora olmaması amacıyla; ticari bir firmaya ait UHT tercih edilmiş, kıyma örneği ise Ankara piyasasından temin edilerek, 25 g tartılıp, alüminyum folyo ile paketlenerek Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde 10 kGy doz değerinde ışınlanarak sterilize edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Aktif kültür denemesi

3.2.1.1 Aktif mikroorganizma kültürlerindeki sayının belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak olan mikroorganizmalar, tryptic soy brotha (TSB; Merck 1.05459) aşılanıp 37 ^{o}C'de 1 gece inkübe edilerek aktifleştirilmişlerdir (Kang vd. 2015). İnkübasyon sonrası maximum recovery diluent (MRD; Merck 1.12535) içeren tüplerde 1:9 oranında standart yöntemle seyreltmeler yapılmış ve *S.* Enteritidis ile *S.* Typhimurium XLD agar (Merck 1.105287), *E. coli* ise Fluorocult VRB (FVRB) agar (Merck 1.04030) besiyerinde yayma yöntemi ile sayıları belirlenmiştir (Anonim 2005).

3.2.1.2 Aktif kültürle önzenginleştirme denemesi

Çalışmanın ilk aşamasında bakteriler, TSB'ye aşılanıp 37 ^{o}C'de 1 gece inkübe edilerek aktifleştirilmişlerdir. Daha önceden inkübasyon sonrası tespit edilen bakteri sayılarına göre en düşük miktarda ilave edilecek şekilde seyreltmeleri yapılıp, 25 g-mL kıyma ya da süt eklenmiş 225 mL TPS ya da LB'ye aktif *S.* Enteritidis + *E. coli* ya da *S.* Typhimurium + *E. coli* olacak şekilde inokülasyonlar yapılmıştır. İnoküle edilen bakterilerin örneklere ne kadar ilave edildiği yani başlangıç inokülasyonun sayısı *Salmonella* için XLD agar, *E. coli* ise FVRB agarda standart yöntemle belirlenmiştir. Et veya süt eklenmiş iki önzenginleştirme besiyeri 37 ^{o}C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her 15; 18; 21 ve 24. saatlerde pH kontrolü yapılıp, bu sürelerde *Salmonella* ve *E. coli* sayımları yapılmıştır.

3.2.1.3 Selektif zenginleştirme aşaması

Bu aşamada, ISO'nun önermiş olduğu yöntemle devam edilmiştir. Zenginleştirme aşaması için 10'ar mL'lik RVS broth (Merck 1.07700) ve Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth (Merck 1.05878) deney tüplerine

hazırlanmıştır. LB ve TPS besiyerinden 15; 18; 21 ve 24. saatlerde *Salmonella* ve *E. coli* sayımları yapılırken ayrıca belirlenen bu sürelerde RVS brotha 0.1 mL, MKTTn brotha 1 mL inokülasyon yapılmıştır. RVS broth besiyeri 42±0.2 ^{o}C'de 24±2 saat ve MKTTn broth besiyeri ise 35±2.0 ^{o}C'de 24±2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası sterilize edilip hazırlanan XLD agar ve xylose lysine tergitol-4 (XLT-4) agar (Merck 1.13919) besiyerlerine selektif zenginleştirme brothların her birinden yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır.

3.2.2 Zayıflatılmış kültür denemesi

3.2.2.1 *Salmonella*'nın zayıflatılması

Gıda materyalinden *Salmonella* geri alınması aşamasında, çeşitli önzenginleştirme besiyerleri arasındaki farklılığın belirlenmesinde aktif bakteriye kıyasla stres altındaki bakterinin kriter olarak alınması gerektiği ve böylelikle gerçekçi stres faktörlerinin *Salmonella* üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılması için ortam yaratılmak istenmiştir. *Salmonella* serotiplerinin strese sokulması amacıyla asetik asit ile muamele uygulanmıştır (Al-Nabulsi vd. 2014, Burin vd. 2014). Bu amaçla çalışmada kullanılan iki *Salmonella* serotitipi, TSB'ye aşılanıp 37 ^{o}C'de 1 gece inkübe edilerek aktifleştirilmiş, daha sonra üzerlerine asetik asit ilave edilerek ortamın pH'sı 4.0; 4.3 ve 4.5'e ayarlanarak bakterilerin strese girmesi sağlanmıştır. Bu pH'larda 0; 15; 30 ve 60. dakikalarda sayım yapılmış ve sonuçlara göre en uygun pH ve süre seçilmiştir.

3.2.2.2 Zayıflatılmış kültürle önzenginleştirme denemesi

Strese sokulmuş bakteriler ile yukarda "aktif kültür denemesi" bölümünde anlatıldığı şekilde devam edilmiştir. Her iki gıda için de sırasıyla aynı işlem basamakları uygulanmıştır.

3.2.3 İstatistiksel analizler

Tüm çalışmalar 2 tekerrürlü olarak uygulanmıştır. Analiz sonuçları SAS programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Patojen *Salmonella* serotiplerine en çok rastlanılan gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler gelmektedir (Var ve Evliya 1995, Timme vd. 2012, Ahn vd. 2013). Hammadde, işleme teknolojisi ve depolama/ pazarlama koşulları *Salmonella* riskinin daha da artmasına sebep olmaktadır (D'aust 1997, Torlak vd. 2013). Bu çalışma kapsamında seçilen gıdalar, hem hayvansal ve işlenen ürünler hem de mikroflorasındaki kültürlerin gelişimi sırasında bünyesinde bulunan organik maddeleri kullanarak oluşturmuş olduğu asit miktarları ile farklı ortam oluşmasına sebebiyet vermesi seçimimizi bu iki gıdaya yöneltmiştir.

4.1 Aktif Kültür Deneme Sonuçları

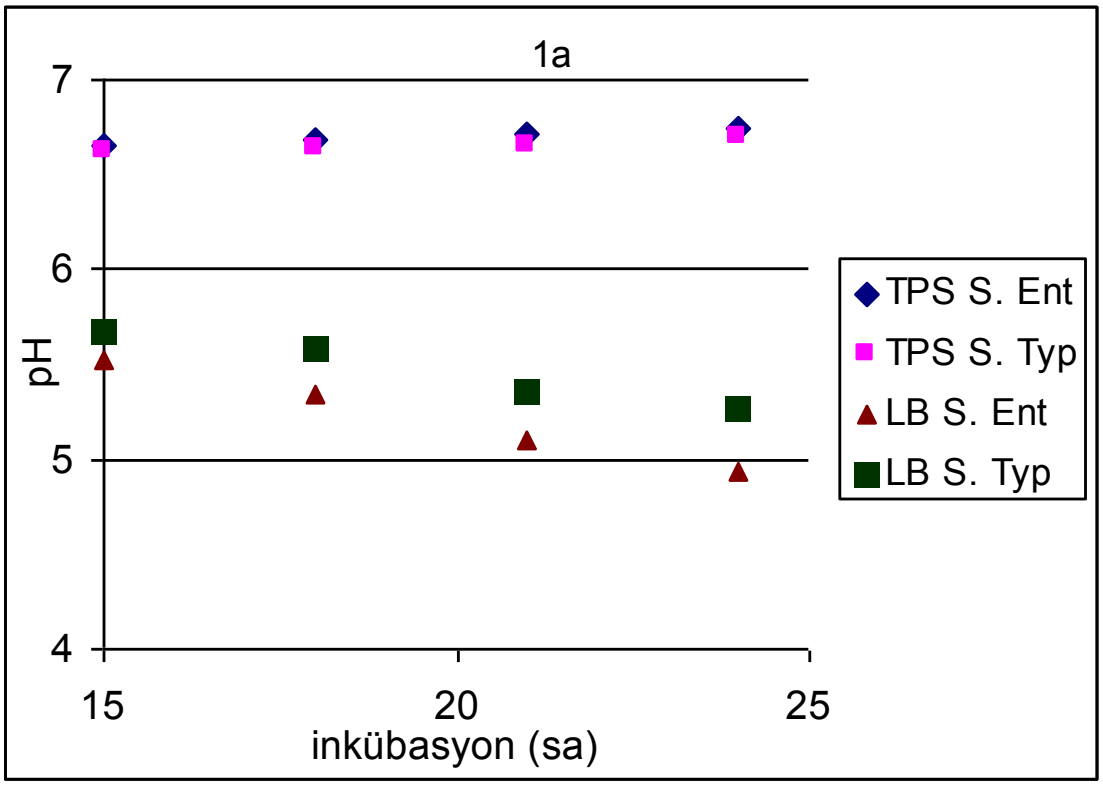
Süt ve kıyma örnekleri ile birlikte önzenginleştirme besiyerine düşük miktarlarda ilave edilen kültür kombinasyonlarının başlangıç sayım sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Kültürlerin başlangıç inokülüm sayıları özellikle düşük tutulmaya çalışılmıştır. Ayrıca gıda numuneleri ve kültürler ilave edilmeden önce önzenginleştirme besiyerlerinin başlangıç pH kontrolleri de yapılmıştır. pH kontrolü, önzenginleştirme besiyerindeki mikrofloranın davranışına göre değişen asitliğin takibi açısından önemlidir. Çalışma sürecinin her aşamasında kontrol edilen başlangıç pH değerleri TPS için 7.02±0.05 iken, LB'de 6.88±0.08 şeklinde olmuştur.

Çizelge 4.1 Önzenginleştirme besiyerlerine eklenen aktif kültürlerin gıda örneklerine göre başlangıç sayıları (log KOB /250 mL)

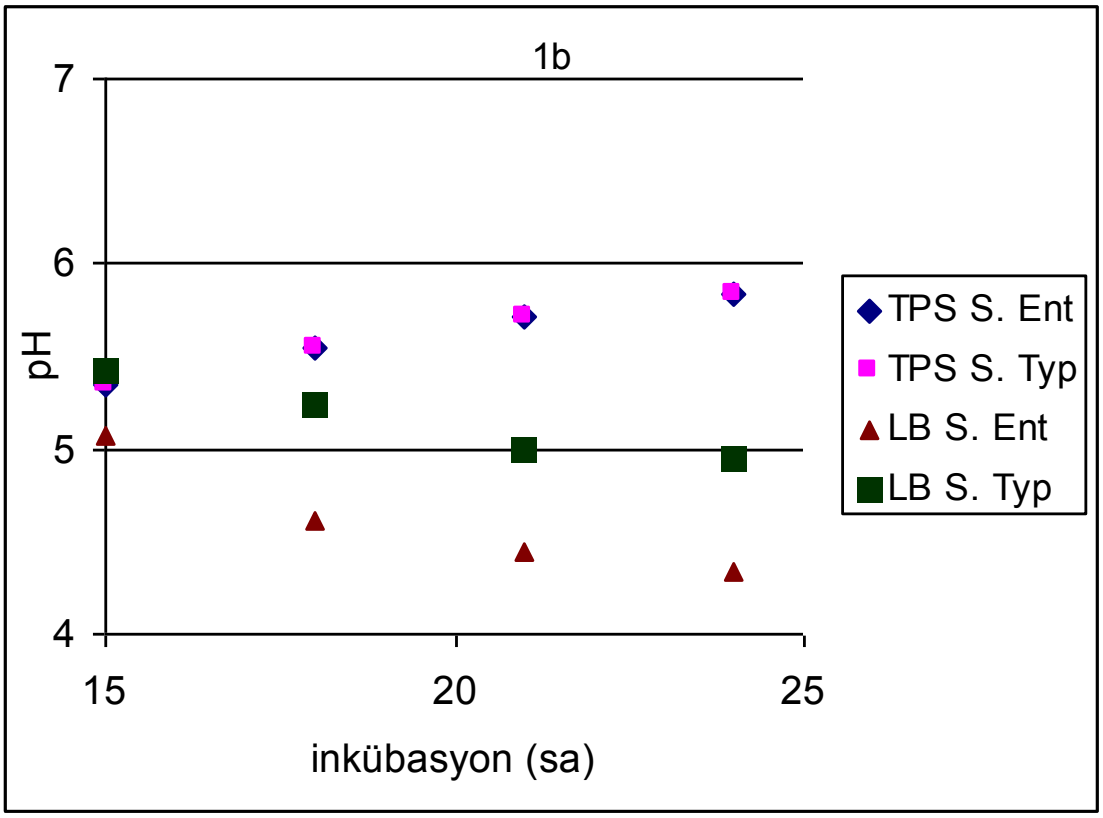
Gıda Örnekleri	*E. coli*	*S.* Typhimurium	*S.* Enteritidis
UHT Süt	2.39±0.29	2.49±0.43	2.16±0.15
Kıyma	1.82±0.12	1.66±0.31	1.88±0.19

Önzenginleştirme aşamasında; toplam 24 saatlik inkübasyon sürecinde 15; 18; 21 ve 24. saatlerde pH değişimi Şekil 4.1 - 4.2'de verilmiştir. Kıymada TPS'de her iki serotip

birbirlerine çok yakın pH değerleri vermiş ve pH 6.63±0.02 - 6.74±0.01 aralığında değişmiştir. Gerek serotip gerek inkübasyon süresi açısından istatistiksel açıdan fark görülmemiştir (P >0.05). LB önzenginleştirme ortamında pH daha düşük seyretmiş, *S.* Enteritidis serotipinde, *S.* Typhimurium serotipine kıyasla zaman içinde pH biraz daha fazla düşmüştür. Kıyma örneğinde TPS ile LB arasında pH açısından istatistiksel açıdan önemli fark bulunmuştur (P <0.05). Bu sonuç normaldir çünkü LB besiyerinde pH'yı nötralize edebilecek/ tamponlayabilecek bir bileşen yoktur.



Şekil 4.1 Aktif kültürde kıymada pH değişimi



Şekil 4.2 Aktif kültürde sütte pH değişimi

Aktif *Salmonella* kültürleri ile aşılanan sütte pH değişimi kıymaya göre farklı bir seyir izlemiştir. Yine her iki *Salmonella* serotipi TPS'de birbirlerine çok yakın pH değerleri vermişler ve gerek serotip gerek inkübasyon süresi açısından istatistiksel açıdan fark görülmemiştir (P >0.05). LB besiyerinde *S.* Enteritidis olan kombinasyonda *S.* Typhimurium olana kıyasla zaman içinde pH daha fazla düşmüştür (P <0.05). Kuşkusuz burada pH'nın daha fazla düşmesinden sorumlu olan *S.* Enteritidis değildir. Çünkü LB bileşiminden ve içindeki süt numunesinden asit oluşturabilecek metabolizmaya sahip değildir.

TPS bileşimi "peptone 10.0 g/L; NaCl 5.0 g/L; $Na_2HPO_4.12H_2O$ 9.0 g/L; K_2HPO_4 1.5 g/L" ve LB bileşimi "peptone 5.0 g/L; meat (beef) extract 3.0 g/L; lactose 5.0 g/L" şeklindedir. TPS'de gelişen bakteriler başka bir karbon kaynağı olmaması nedeniyle gelişmeleri için gereken azot ve karbon (enerji) kaynağı olarak peptonu kullanırlar. Peptonların kullanımı ile pH'da bir miktar yükselme olur ancak fosfat tamponlar pH'da

bakteri gelişimini engelleyecek değişime izin vermezler. LB'de tampon görevini üstlenecek bileşenler yoktur ve ayrıca alternatif karbon kaynağı olarak laktoz vardır. *Salmonella* gibi laktozu karbon kaynağı olarak kullanamayan bakteriler, azot ve karbon gereksinmelerini besiyeri bileşimindeki pepton ve et özütünden karşılarlar. Besi ortamında sadece *Salmonella* gibi laktoz negatif bakteriler varsa pH'da yükselme olması beklenir. *E. coli*, laktoz pozitiftir ve karbon kaynağı olarak laktozu kullanır. Laktozun metabolize edilmesi sonunda asidik ürünler ortaya çıkar. *E. coli*, azot gereksinimini karşılamak için pepton ve/ veya et özütünü kullanmak zorundadır. Bu sırada pH bir miktar yükselir ancak oluşturulan asitler, bazik ürünlerden daha fazla olduğu için pH'da inkübasyon süresi içinde gözle görülür bir azalma olur. Buna bağlı olarak LB'de süt numunesi ile çalışılırken *S.* Enteritidis olan kombinasyonda pH'nın daha düşük olarak ölçülmesinin nedeni, *S.* Typhimurium olan kombinasyonda bu serotipin peptonların parçalanma ürünlerini daha fazla oluşturarak pH'yı diğer serotipe kıyasla daha fazla yükselttiği düşünülebilir (Tunail 2009, Barrow ve Feltham 2004, Dwivedi vd. 2014, Ray ve Bhunia 2016).

Yapılan bir rekabet çalışmasında *Lactobacillus crispatus* ve *Clostridium lactatifermentans* karışık ve tek kültürlerinin yapay etlik piliç bağırsak ortamında *S.* Enteritidis serotipi üzerinde inhibisyon etkisi 5.8 ve 7.0 pH'larda araştırılmış ve sonuçta inhibisyonda görülen fark laktozdan oluşan laktat, asetat ve propiyonat ile ilişkilendirilmiştir (Van der Wielene vd. 2002).

Bir başka araştırmada ise (Kang vd. 2015), *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium ve *Listeria monocytogenes* inaktivasyonunda pH ve ohmik ısıtmanın etkisi araştırılmış ve pH'nın etkisi gösterilmiştir.

Çizelge 4.2'de kıyma ve süte aktif halde inoküle edilen *Salmonella* serotiplerinin önzenginleştirme besiyerlerinde inkübasyon süresi boyunca gelişimi verilmiştir.

Çizelge 4.2 Kıyma ve süte aktif halde inoküle edilen *Salmonella* serotiplerinin iki farklı önzenginleştirme besiyerinde önzenginleştirme süresi boyunca mikroorganizma gelişimi (log KOB/ g-mL)

Gıda	İnkübasyon (s)	*S.* Enteritidis		*S.* Typhimurium	
		TPS	LB	TPS	LB
Süt	15	8.08 ± 0.18^{aA}	7.52 ± 0.38^{aA}	8.09 ± 0.01^{aB}	7.50 ± 0.15^{aA}
	18	8.19 ± 0.19^{aA}	7.35 ± 0.45^{aA}	8.12 ± 0.11^{aAB}	7.44 ± 0.50^{aA}
	21	8.20 ± 0.09^{aA}	6.68 ± 1.08^{aA}	8.23 ± 0.01^{aAB}	6.41 ± 1.53^{aA}
	24	8.20 ± 0.06^{aA}	6.40 ± 1.50^{aA}	8.36 ± 0.10^{aA}	5.31 ± 2.06^{aA}
Kıyma	15	7.92 ± 0.18^{aA}	7.68 ± 0.28^{aA}	8.20 ± 0.12^{aA}	7.79 ± 0.14^{aAB}
	18	8.03 ± 0.01^{aA}	7.12 ± 0.17^{bA}	8.27 ± 0.07^{aA}	7.99 ± 0.04^{aA}
	21	8.14 ± 0.22^{aA}	7.42 ± 0.02^{aA}	8.30 ± 0.08^{aA}	7.96 ± 0.02^{aA}
	24	8.15 ± 0.25^{aA}	6.80 ± 0.50^{aA}	8.38 ± 0.08^{aA}	7.59 ± 0.02^{aB}

[a,b] Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P <0.05) [A,B] Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P <0.05)

E. coli, gerek kıyma gerek süt numunesinde, TPS ve LB ortamlarında ve her iki serotipin varlığından etkilenmeden standart gelişimini sürdürmüştür ve çok yaklaşık olarak 8-9 log KOB/g-mL sayım sonucu vermiştir (P >0.05). Özellikle süt numunesinde LB ortamındaki inkübasyonda düşen pH'ya rağmen gelişmesini kolaylıkla sürdürebilmesi *E. coli*'nin *Salmonella* serotiplerine kıyasla aside daha dirençli olması ile açıklanabilir.

Önzenginleştirme aşamasından sonra *Salmonella*'nın geri alınımı kontrol amaçlı olarak ISO'nun önerdiği şekilde devam edilmiştir. LB ve TPS besiyerinden 15; 18; 21 ve 24. saatlerde selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan RVS ve MKTTn broth besiyerlerine inokülasyon yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında *Salmonella* varlığını kontrol etmek adına kullanılan XLD ve XLT-4 agar besiyerlerinin seçilen inkübasyon sürelerinin hepsinde *Salmonella*'nın tipik koloni morfolojisi gözlemlenmiştir. Önzenginleştirme sonrası oldukça yoğun miktarda *Salmonella*'nın

bulunmasının da etkisiyle RVS ve MKKTn broth besiyerlerinin birbirlerine herhangi bir üstünlükleri tespit edilmemiştir.

4.2 Zayıflatılmış Kültür İnoküle Edilmiş Önzenginleştirme Besiyerinden *Salmonella* Geri Alınma Sonuçları

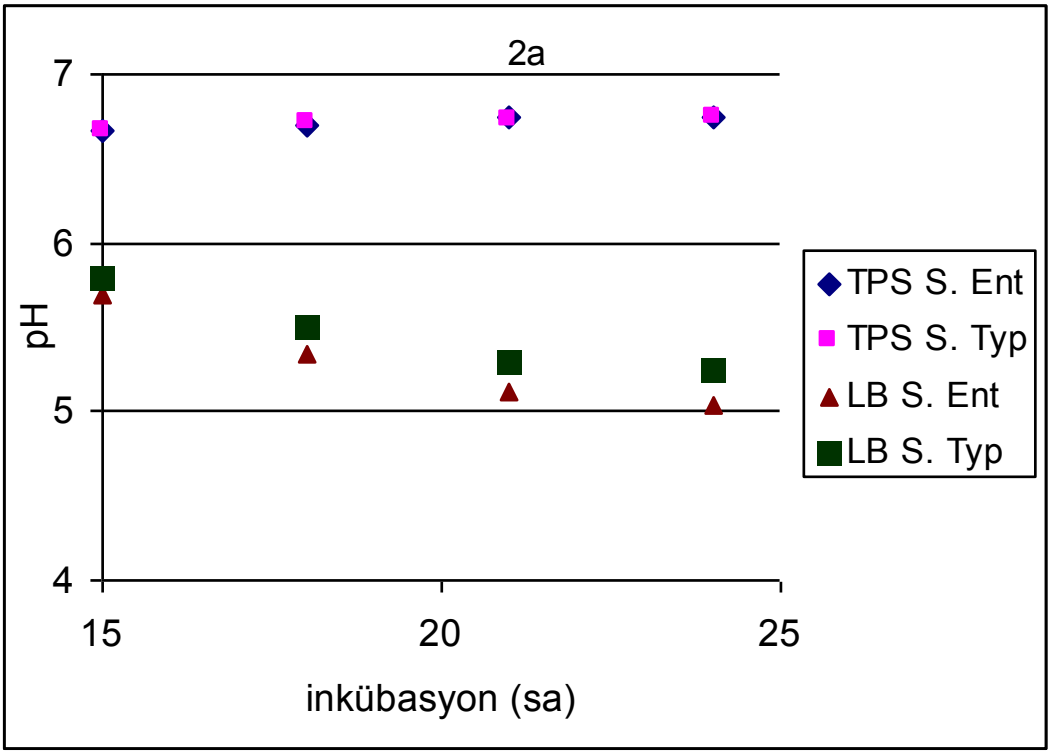
Analizlerin ikinci aşamasında, *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium serotiplerinin zayıflatılması amacıyla asetik asit ile daha önceden belirlenen pH ve süre kombinasyonuyla muamele edilmiştir (Çizelge 4.3). Yapılan denemeler sonucunda en uygun pH değeri 4.3 ve süre ise 60 dk olarak belirlenmiş ve *Salmonella* serotipleri bulunan bu sonuçlar doğrultusunda asetik aside maruz bırakılmıştır (Yuk vd. 2014, Kang vd. 2015). Bu aşamada *E. coli* için herhangi bir zayıflatma işlemi uygulanmamıştır. Amaç *Salmonella* için *E. coli* varlığında gıda içerisinde doğal bir ortam yaratılmak istenmesidir.

Çizelge 4.3 *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium'un pH 4.3'te asetik asit ile muamelesi sonrası belirlenen sürelerde alınan sayım sonuçları (log KOB/mL)

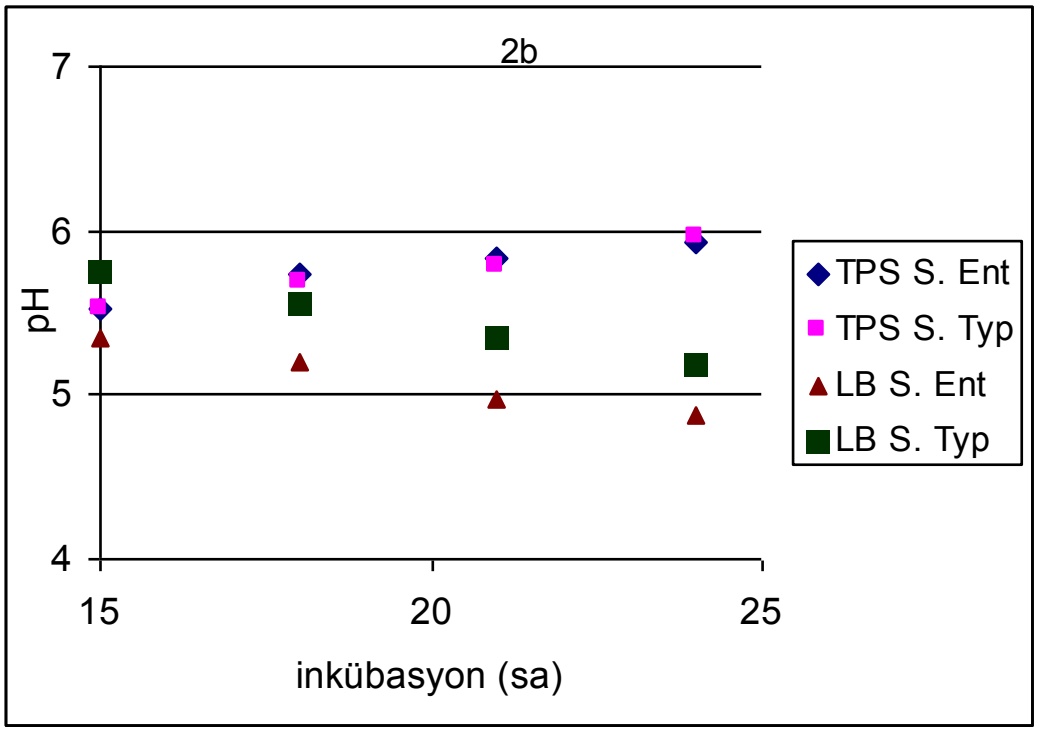
Süre (dk)	*S.* Enteritidis	*S.* Typhimurium
0	8.04±0.29	8.06±0.72
15	7.11±0.11	7.30±0.62
30	6.03±0.06	6.27±0.65
60	4.95±0.10	5.05±0.16

TPS ve LB'ye inoküle edilen kültür kombinasyonlarının başlangıç sayım sonuçları *E. coli* için 3.3±0.19; *S.* Typhimurium için 2.38±0.12 ve *S.* Enteritidis için 2.51±0.2 log KOB /250 mL-g şeklindedir.

Çalışmanın devamı ilk aşamadaki gibi sürdürülmüştür. Zayıflatılmış *Salmonella* serotiplerinin bir koliform grup bakteri olan aktif *E. coli* suşu ile farklı önzenginleştirme besiyerlerinde birbiri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Önzenginleştirme aşamasında; 24 saatlik inkübasyon sürecinde 15; 18; 21 ve 24. saatlerde pH değişimi şekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3 Pasif kültürde kıymada pH değişimi



Şekil 4.4 Pasif kültürde sütte pH değişimi

pH değişimi açısından, zayıflatılmış *Salmonella* serotipleri ile yapılan deneme de aktif kültürler ile yapılan deneme sonuçlarına kısmen benzemektedir çünkü LB ortamında da pH düşüşünden sorumlu olan bakteri *E. coli* olup, bu bakteriye herhangi bir zayıflatma işlemi uygulanmamıştır. LB'de pH azalması TPS'ye göre istatistiksel olarak farklıdır (P <0.05). Ancak, bu uygulamada *Salmonella* serotipleri arasında aktif kültürdekinden farklı olarak pH değişiminde fark görülmemiş, her 2 serotipin varlığında ve her 2 gıda numunesinde pH aynı şekilde düşmüştür (P >0.05). Bu sonuç, aktif kültürde *S.* Typhimurium'un daha fazla metabolik aktivite göstererek pH'yı yükselttiği şeklindeki yorumu desteklemektedir. Bir diğer deyiş ile zayıflatılma uygulaması özellikle *S.* Typhimurium için daha etkili olmuş ve pH'yı yükseltebilecek yeterli metabolik aktivite gösterememiştir.

Çizelge 4.4'te 15, 18, 21, 24. saat inkübasyon sürelerinde zayıflatılmış *Salmonella* serotiplerinin sayısındaki değişim verilmiştir. Aktif kültürle yapılan denemede olduğu gibi *S.* Enteritidis serotipi her 2 gıda numunesi ve önzenginleştirme ortamından etkilenmemiş (P >0.05), ancak *S.* Typhimurium LB'de daha düşük sayılar vermiştir (P <0.05). *E. coli* ise, gıda numunesi, önzenginleştirme besiyeri ve *Salmonella* serotipinden etkilenmeyip yine çok yaklaşık olarak 8 - 9 log KOB/g-mL sayım sonucu vermiştir (P >0.05).

Çizelge 4.4 Kıyma ve süt örneğinde zayıflatılmış halde inoküle edilen *S.* Enteritidis ve *S.*Typhimurium serotiplerinin iki farklı önzenginleştirme besiyerinde önzenginleştirme süresi boyunca mikroorganizma gelişimi (log KOB/g-mL)

Gıda	İnkübasyon (s)	*S.* Enteritidis		*S.* Typhimurium	
		TPS	LB	TPS	LB
Kıyma	15	8.03±0.18^{aA}	7.77±0.16^{aA}	6.36±0.16^{aA}	4.44±0.08^{aA}
	18	7.99±0.18^{aA}	7.45±0.44^{aA}	6.62±0.28^{aA}	4.71±0.14^{bA}
	21	8.11±0.13^{aA}	6.10±1.22^{aA}	6.56±0.22^{aA}	3.65±0.35^{bA}
	24	8.03±0.08^{aA}	6.41±1.16^{aA}	7.02±0.09^{aA}	4.10±0.12^{bA}
UHT Süt	15	8.19±0.01^{aA}	7.50±0.42^{aA}	4.60±0.08^{aA}	3.96±1.06^{aA}
	18	8.11±0.06^{aA}	7.45±0.63^{aA}	4.93±0.62^{aA}	4.02±1.42^{aA}
	21	8.14±0.11^{aA}	7.40±0.43^{aA}	5.20±0.16^{aA}	4.85±2.25^{aA}
	24	8.05±0.05^{aA}	7.25±0.32^{aA}	5.70±0.20^{aA}	4.37±1.57^{aA}

^{a,b} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P <0.05). ^{A,B} Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (P <0.05)

Ramnani vd. (2010), baharat içeren yüksek asitli gıdalarda *S.* Typhimurium serotipinin geri alınması üzerine yaptıkları bir çalışmada 3 log KOB/ 250 mL ve daha az sayıda bakteri varlığında bazı durumlarda geri alamama sorununu çift kuvvetli TPS kullanarak asitliğin daha iyi nötralize edildiğini ve bu şekilde sorunun çözüldüğünü bildirmişlerdir. *Salmonella* analizinde özellikle asit karakterli gıda numuneleri ile çalışıldığında çift kuvvetli önzenginleştirme besiyeri kullanılması Dwivedi vd. (2014) tarafından da önerilmektedir.

Zayıflatılmış kültür denemesinde, selektif zenginleştirme aşaması kısmı aktif kültür denemesinde uygulanan standart ile devam edilmiştir. XLD ve XLT-4 agar besiyerlerinde *Salmonella*'nın tipik koloni morfolojisi gözlemlenmiştir. Bu iki besiyerinde *Salmonella*'nın yoğun olması durumundan kaynaklı her iki selektif zenginleştirme besiyerleri arasında bir kıyaslama yapılamamıştır.

5. SONUÇ

Salmonella, bilinen en tehlikeli gıda kaynaklı patojenlerden biri olmasına rağmen, gıdalarda refakatçi flora olarak bulunan başta *E. coli* olmak üzere diğer bakterilere kıyasla fizyolojik karakterler bakımından daha zayıftır. Asitlik, çeşitli kimyasallar, düşük sıcaklık vb. olumsuz koşullardan önemli ölçüde etkilenir. Hasar görme (stres) derecesine bağlı olarak selektif katı besiyerlerinde gelişip koloni oluşturamayabilir. Bu gibi mikroorganizmalar "canlı ancak kültüre alınamayan; Viable but non-culturable (VBNC)" olarak tanımlanırlar. Devamında *Salmonella*, dışkı kökenli enterik bir bakteri olduğu için *Salmonella* bulaşmış gıdalarda aynı çevresel kökenden gelen başta koliform grup bakteriler olmak üzere çok sayıda tür ve miktarda refakatçi flora bulunur.

Bu çalışmada iki önemli uluslararası kuruluş tarafından önerilen önzenginleştirme besiyerleri karşılaştırılmış ve inkübasyon sürecinde çeşitli inkübasyon sürelerinde mikroorganizma gelişimi izlenerek pH ile birlikte sayıdaki değişim gözlemlenmiştir. Serotip farkının da önemli olup olmadığının araştırılması için 2 farklı *Salmonella* serotipi denenmiştir. Analizler sonucunda UHT süt ve kıyma numuneleri için önzenginleştirme aşamasında belirlenen inkübasyon sürelerinde yapılan analizler sonucunda *S.* Enteritidis serotipinin aktif ve zayıflatılmış olması, önzenginleştirme besiyerlerindeki farklılık, mikroorganizma sayısında istatistiksel olarak fark oluşturmamıştır ($P > 0.05$). Ancak zayıflatılmış *S.* Typhimurium serotipinde LB'deki sayı TPS'den daha düşüktür ($P < 0.05$).

Her iki gıda numunesinde de inkübasyon süresince pH, TPS'de stabil kalmış ancak beklenildiği gibi LB'de düşmüştür. Bununla beraber, pH'daki düşüş, *Salmonella* serotiplerinin tümüyle yok olmasına yetecek düzeyde olmamıştır.

Sonuç olarak; denemelerde kullanılmış olan aktif ve zayıflatılmış *Salmonella* suşları, önzenginleştirme amacıyla kullanılan LB ve TPS besiyerleri, kıyma ve süt numuneleri arasında kimi koşullarda fark bulunmuşsa da, her koşulda selektif besiyerinde *Salmonella* sayım sonucu alınmıştır

KAYNAKLAR

Ahmed, O.B., Asghar, A.H., Abd El-Rahim, I.H. and Hegazy, A.I. 2014. Detection of *Salmonella* in Food Samples by Culture and Polymerase Chain Reaction Methods. *J Bacteriol Parasitol* 5:187. doi: 10.4172/2155-9597.1000187

Ahn, D.U., Kim, I.S. and Lee, E.J. 2013. Irradiation and Additive Combinations on The Pathogen Reduction and Quality of Poultry Meat. *Poult Sci* 92, 534-545. doi: 10.3382/ps.2012-02722.

Akkaya, L. ve Alişarlı, M. 2006. Afyonkarahisar'da Tüketime Sunulan Peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. Varlığının Belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg* 17 (1-2):87-91.

Al-Nabulsi A.A., Olaimat A.N., Osaili T.M., Shaker R.R., Elabedeen N.Z., Jaradat Z.W., Abushelaibi A. and Holley R.A. 2014. Use of Acetic and Citric Acids to control *Salmonella* Typhimurium in tahini (sesame paste). *Food Microbiol* 42, September 102-108. doi: 10.1016/j.fm.2014.02.020

Anonim. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 358 s. ISBN : 975–00373–0–8

Anonim. 2010. Gıda ve Hayvan Yemleri - *Salmonella*. Türk Standartları Enstitüsü TS EN ISO 6579/A1. Ankara, 7 s.

Anonim. 2013. Gıda Kaynaklı *Salmonella* İnfeksiyonları ve Son Durum. http://www.ggd.org.tr/icerik.php?id=462, Erişim Tarihi: 20.02.2017

Anonymous. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition. Eds R.E. Buchanon, N.E. Gibbons. The William Wilkins Comp, Baltimore, 1246s.

Anonymous. 1984. Bacteriological Analytical Manual. 6th Edition. US Food and Drug Administration. Published and Distributed by Association of Official Analytical Chemist (AOAC), Virginia. 31. Bölüm + 3 Ek.

Anonymous. 2002. Microbiology of The Food Chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Draft International Standard ISO/DIS 579. International Organisation for Standardization ISO. Switzerland, 48 s.

Anonymous. 2003. Isolation of *Salmonella*. Global *Salmonella* Surveillance and Laboratory Support Project of The World Health Organization.http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/*Salmonella*1_pdf.pdf (Erişim: 19.04.2017)

Anonymous. 2011. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Linked to Turkish Pine Nuts. Available at:http://www.cdc.gov/*Salmonella*/pinenuts-enteriditis/111711/index.html, Erişim Tarihi: 24.05.15.

Anonymous. 2014. Web Sitesi: https://www.biotek.com/resources/application-notes/concentration-and-detection-of-low-levels-of-escherichia-coli-o157h7 listeria-monocytogenes-4b-and-*Salmonella*-enterica-typhimurium-in-high-organic-load-lettuce-wash/, Erişim Tarihi: 17.11.2016.

Anonymous. 2016a. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* -- Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique. ISO/TS 6579-2:2012 http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=56713, Erişim Tarihi: 18.09.2016.

Anonymous. 2016b. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5 *Salmonella*. http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm, Erişim Tarihi: 20.08.2016.

Anonymous. 2017. Commission regulation (EU) No 1086/2011http://eurlex. europa. eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02011R1086- 20111117, Erişim Tarihi: 20.02.2017.

Aytaç, S.A. ve Taban, B.M. 2010. Gıda kaynaklı intoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi. Ed O. Erkmen. Eflatun Basım Dağıtım Yayıncılık Ltd., Ankara, 552 s. ISBN: 978-605-4334-02-5

Barrow, G.L. and Feltham, R.K.A. (Eds). 2004. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd Edition. Cambridge University Pres, U.K., 352 pp. ISBN: 9780521543286

Briggs, T., Shah, T. and Kibala, J. 2013. Enrichment Media Comparison for Testing Whey Protein Powder Using the Atlas *Salmonella* Detection Assay, International Association for Food Production. July 28-31, North Carolina, ABD.

Burin, R.C.K., Silva Jr., A. and Nero, L.A. 2014. Influence of lactic acid and acetic acidon *Salmonella* spp. growth and expression of acid tolerance-related genes. *Food Res Int*, October, 726-732. http://dx.doi.org/10.1016/j. foodres. 2014.08.019

Cutter, C.N., Scheinberg, J.A. and Svoboda, A.L. 2014. High-pressure processing and boiling water treatments for reducing *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* during beef jerky processing. *Food Control* 39, 105-110.

D'aust, J.Y. 1997. *Salmonella* species. Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. Eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville. American Society for Microbiology, Washington, USA, 768 pp.

Dwivedi, H.P., Mills, J.C. and Devulder, G. 2014. Enrichment. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson, R. (chief Ed.) 2nd Edition. Vol 2. Elsevier Ltd, Oxford, UK. pp 637-643. ISBN: 9780123847331

Doğan, H.B. 1993. Gıda maddelerinde *Salmonella* aranması üzerinde karşılaştırmalı bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniv., Fen Bilimleri Ens., Gıda Müh. AbD. Ankara.

Doğan, H.B., Halkman, A.K. ve Rahati Noveir, M. 1994. Gıdalarda Hızlı *Salmonella* Kontrolü Üzerine Bir Araştırma. GIDA 19(5), 305-311.

Ekici, L., Telli, R. ve Yetim, H. 2008. Gıda Kaynaklı Enfeksiyon ve İntoksikasyon Bakterileri- I. Gıda Teknolojileri Araştırma Dergisi, 2, 29-42.

Erol, İ. 2007. Gıda hijyeni ve mikrobiyolojisi. 1. Baskı. Pozitif Matbaacılık. Ankara, 392s. ISBN: 978-975-00131-0-9.

Foley, S., Zhao, S. and Walker, R. 2007. Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. Foodborne Pathog Dis, Vol. 4; pp. 253–276.

Giaccone, V., Catellani, P. and Alberghini, L. 2012. Food as Cause of Human Salmonellosis. Barakat S.M. Mahmoud (Ed.), *Salmonella* – A Dangerous Foodborne Pathogen (Vol. 3, pp. 47-72).

Halkman, A.K., Doğan, H.B. ve Rahati Noveir, M. 1994. Gıda Maddelerinde *Salmonella* ile *E. coli* Arama ve Sayılma Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Gıda Tek. Der*. Yayın No: 21, Armoni Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 93s

Halkman, A.K. 2013. Gıda mikrobiyolojisi II ders notları. Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Basılmamış.

Hirneisen, K., Cheng, C.M. and Williams-Hill, D. 2013. Developing a Universal Enrichment Broth for the Foodborne Bacterial Pathogen *Salmonella*. International Association for Food Production. July 28-31, North Carolina, ABD.

Hitchins, A.D. and Jinneman, K. 2011. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in; Bacteriological Analytical Manual; BAM. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm.

Holbrook, R., Anderson, J.M., Baird-Parker, A.C. ve Doos, L.M. 1989. Rapid detection of *Salmonella* in foods- a convenient two day procedure. *Lett Appl Micr* 8: 139-142.doi: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00259.x

Ibrahim, G.F. 1986. A review of immunoassays and their application to *Salmonella* detection in foods. *J Food Prot* 49(4)299-310.

Juneja, V.K., Valenzuela-Melendres, M., Heperkan, D., Bautista, D., Anderson, D., Hwang, C., Peña-Ramos, A., Camou J.P. and Torrentera-Olivera, N. 2016. Development of a predictive model for *Salmonella* spp. reduction in meat jerk product with temperature, potassium sorbate, ph, and water activity as controlling factors. *Int J Food Microbiol* 236, 1-8. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.028

Kang, D.H., Lee, J.Y. and Kim, S.S. 2015. Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. LWT - *Food Sci Techno* 62, June, 83-88. doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.020

Karaca, B. 2011. Türkiye'den İzole Edilen *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. 119. Ankara.

Köse, S. 1993. Investigation into Toxins and Patogens Implacetad in Fish Meal Production. Doktora Tezi. Lougborough University of Technology, 215, Lougborough, UK.

Lake, R., Hudson, A. and Peter, C. 2002. Risk Profile: *Salmonella* (non Typhoid) in Polutry (Whole and Pieces), Institute of Enviromental Science&Research Limited Christchurcch Science Centre (ESR), New Zealand.

Lee, K.M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R. and Hsieh, J. 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control* 47, 264-276. Doi: 0.1016/j.foodcont.2014.07.011

Lehmacher, A., Bockemühl, J. and Aleksic, S. 1995. Nationwide Outbreak of Human Salmonellosis in Germany due to Contaminated Paprika-Powdered Potato Chips. *Epidemiol Infect*. 115, 501-511.

Liandris, E., Gazouli, M., Taka, S., Andreadou, M., Vaiopoulou, A., Tzimotoudis, N., Kasampalidis, I., Mpaseas, D., Fyliousis, G., Poltronieri, P., Cook, N. and Ikonomopoulos, J. 2014. Evaluation of the microbial safety of child food of animal origin in Greece. *J Food Sci*. 79(3):M362-368. doi: 10.1111/1750-3841.12366.

Montville, T.J. and Mathews, K.R. 2007. Growth, Survival and Deaths of Microbes in Foods. In "Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers 3rd Ed. Edited by M.P. Doyle and L.R. Beuchat" ASM Pres. Washington D.C.

Mutluer, B. 1991. Kanatlı etlerinde *Salmonella* Kontrolü, Uluslararası Tavukçuluk Kongresi, 22-25 Mayıs, İstanbul.

Myint, M.S., Johnson Y.J., Tablante N.L. and Heckert R.A. 2006. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol*. 23(6) 599-604.

Odumeru, J.A. and Leon-Velarde, C.G. 2012. *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients. Barakat S.M. Mahmoud (Ed.), *Salmonella* – A Dangerous Foodborne Pathogen (Vol. 17, pp. 373-392).

Pignato, S., Marino, A.M., Emanuele, M.C., Iannotta, V., Caracappa, S. and Giammanco,G. 1995. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of Salmonellae in foods. *Appl Environ Microbiol* 61(5), 1996-1999.

Ramnani, P., Jarvis, B. and Mackey, B. 2010. Comparison between pre-enrichment insingle- or double-strength buffered peptone water for recovery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 from acidic marinade sauces containing spices. *Food Control* 21, 1303-1306. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.03.005

Rathnayaka, R.M.U.S.K. 2011. Effect of sample pre-enrichment and characters of food samples on the examination for the *Salmonella* by plate count method andfluorescent in-situ hybridization technique. *Am Food Techno* 6: 851-856. doi: 10.3923/ajft.2011.851.856

Ray, B. and Bhunia, A. 2016. Temel gıda mikrobiyolojisi. 5. Basımdan Çeviri. Çeviri Editörü Heperkan, D. Nobel Akademik Yayıcılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd, Ankara, Türkiye, 608 s. ISBN 978-605-320-543-2

Reissbrodt R., Vielitz E., Kormann E., Rabsch W. and Kiihn H. 1996. Ferrioxamine E-Supplemented Pre-Enrichment and Enrichment Media Improve VariousIsolation Methods for *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* 29, 81-91.

Telli, R. 2006. Afyon'da Tüketime Sunulan Tavuk Karkas ve Tavuk Eti Örneklerinde *Salmonella* spp. Varlığının Klasik Kültür Tekniği ile Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. 69. Afyon.

Timme, R.E., Allard, M.W., Luo, Y., Strain, E., Pettengill, J., Wang, C., Li, C., Keys, C.E., Zheng, J., Stones, R.,Wilson, M.R., Musser, S.M. and Brown, E.W. 2012. Draft Genome Sequences of 21 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains. *J Bacteriol*. 194, 5994-5995. doi: 10.1128/JB.01289-12.

Torlak, E. 2011. Gıda mikrobiyolojisinde Enterobacteriaceae üyeleri için kromojenik ve florojenik besiyerleri. *Türk Hij ve Den Biyol Derg* 68(1): 49-58.

Torlak, E., Sert, D. and Serin, P. 2013. Fate of *Salmonella* during sesame seeds roasting and storage of tahini. *Int J Food Microbiol*. 163, 214-217. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.010

Tsai, H.S.C.and Slavik, M.F. 1991. Rapid method for detection of Salmonellae attached to chicken skin. *J Food Saf* 11:205-214.

Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 434 s. ISBN: 978-605-603-62-0-0.

Var, I. ve Evliya, B. 1995. Çeşitli Yumurtalarda *Salmonella* Taraması. GIDA 20(6): 387-391.

Vazgeçer, B. 2004. Broilerlerden Klasik Kültürel Yöntemlerle *Salmonella* İzolasyonunda Çeşitli Yöntem Modifikasyonlarının Denenmesi, Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.106. Ankara.

Vazgeçer, B. ve Temiz, A. 2005. *Salmonella* izolasyonu ve tanımlanması. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 3 (4): 1-27.

Van der Wielene, P.W.J.J., Lipman, L.J.A., van Knapen, F. and Biesterveld, S. 2002. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed batch culture. *Appl Environ Microbiol*. 68(2): 555-559. doi: 10.1128/AEM.68.2.555-559.2002

White, A.P., Gibson, D.L., Kim, W., Kay, W.W. and Surette, M.G. 2006. Thin agregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J Bacteriol*, Vol. 188; pp. 3219- 3227.

Yuk, H.G., Yang, Y., Kadim, M.I., Khoo, W.J., Zheng, Q, Setyawati, M.I., Shin, Y.J. and Lee, S.C. 2014. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella* Enteritidis cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. *Int J Food Microbiol* 191, 24-31. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.034

Zink, D., 2008. Environmental Investigation and Regulatory Response: *Salmonella* Tennessee in Peanut Butter in The United States, 2007. In: IAFP Symposium S1-2008 Foodborne Disease Update: *Salmonella* in Processed Foods. IAFP Annual Meeting, 3e6. Columbus, Ohio.

Zorba, N.N. 2010. Gıda Kaynaklı Enfeksiyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi Ed O. Erkmen. Eflatun Basım Dağıtım Yayıncılık Ltd., Ankara, Türkiye, 552 s. ISBN: 978-605-4334-02-5

EK 1 Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

1 Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)

TS EN ISO 6579'a uygundur. *Enterobacteriaceae* üyeleri için selektif olmayan önzenginleştirme ya da canlandırma besiyeri olarak kullanılmaktadır. Ticari olan dehidre besiyeri 25.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir, 500 ml erlenlere 225' er mL olacak şekilde dağıtılıp ve otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renklidir. Besiyeri bileşiminde bulunan fosfat tampon pH düşmesine karşı özellikle hasar görmüş olan bakterileri korur. Otoklav sonrası 25 ^{o}C'de pH 7.0±0.2'dir.

2 Lactose Broth (Merck 1.07661)

APHA, AOAC, BAM, EP, EPA ve USP standartlarına uygundur. Ticari olan dehidre besiyeri 13.0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, 500 mL erlenlere 225' er mL olacak şekilde dağıtılıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı olup, 25 °C'de pH'sı 6.9±0.2'dir.

3 Muller-Kauffmann Tetrathionate-novobiocin (MKTTn) Broth (Merck 1.05878)

Ticari olan dehidre besiyeri, 89.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilir. Hafifçe ısıtılarak (5 dakika kaynatılarak) sterilize edilir ve hızla soğutulur. Hazırlanan besiyeri bu şekli ile buzdolabı sıcaklığında (2-8 ^{o}C) 4 hafta muhafaza edilebilir. Hazırlanan besiyerine iyot/potasyum iyodür çözeltisi ilave edildikten sonra aseptik koşullara uyularak steril tüplere 10'ar mL dağıtılıp aynı gün kullanılmalıdır. Bu besiyeri otoklavlanmaz, yüksek sıcaklık uygulamalarından kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve yeşil renklidir. Tüpün dibinde $CaCO_3$ kaynaklı beyaz bir çökelti oluşmaktadır.

İyot (Merck 1.04761)/Potasyum iyodür(Merck 1.05043) Çözeltisi

Çözelti hazırlanırken önce 2 mL damıtık su içinde 5 g potasyum iyodür tam olarak çözülür, sonra 4 g iyot eklenip, damıtık su ile 20 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti besiyerine ilave edilip iyice karıştırılır.

4 Rappaport Vassiliadis (RVS) Broth (Merck 1.07700)

TS EN ISO 6579'a uygundur. *Salmonella* için selektif zenginleştirme sıvı besiyeri olarak kullanılmaktadır. Ticari olan dehidre besiyeri 41.8 g/L olacak şekilde damıtık su içinde hafifçe ısıtılarak çözülür, deney tüplerine 10'ar mL dağıtılır ve otoklavda 115 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrası 25 ^{o}C'de pH 5.2±0.2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve koyu mavi renklidir.

XLD Agar (Merck 1.05287)

55.0 g/L ticari dehidre besiyeri içine damıtık su yavaşça eklenir. Topaklanma olmadığından emin oluncaya kadar iyice karıştırılır. Agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutulur ve hızla 45-50 ^{o}C'ye soğutulup steril Petri kutularına 12.5'er mL dökülür. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Bu besiyeri otoklavlanmaz, yüksek sıcaklık uygulamalarından kaçınılmalıdır.. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir, 25 ^{o}C'de pH değeri 7.4±0.2'dir.

6 XLT4 Agar (Merck 1.13919)

Patojenik *Enterobacteriaceae* ve özellikle *Salmonella* için selektif katı besiyeri olarak kullanılır. Ticari olan dehidre besiyeri, 59.0 g/L ve XLT4 agar Supplement (Merck 1.08981) 4.6 mL/L olacak şekilde birlikte damıtık suda kaynatılarak eritilir. Sterilizasyon, besiyeri eritilirken gerçekleşir. Isıya oldukça duyarlı olan bu besiyeri 50 ^{o}C'de 45 dakikadan fazla tutulmamalıdır. Besiyeri, 45-50 ^{o}C'ye soğutulunca hızlı bir şekilde steril Petri kutularına 12.5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızıdır, 25 ^{o}C'de pH'sı 7.4 ±0.2'dir.

7 Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459)

Ticari dehidre besiyeri, 30.0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde hafifçe ısıtılarak eritilip, deney tüplerine 10'ar mL dağıtılır ve otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renkte olup, 25 ^{o}C'de pH'sı 7.3±0.2'dir.

8 Fluorocult Violet Red Bile (FVRB) Agar (Merck 1.04030)

Ticari dehidre besiyeri, 39.6 g/L olacak şekilde damıtık su içinde karıştırılarak kaynatılır ve kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, hızla 45-50 ^{o}C'ye soğutulur ve steril Petri kutularına 12.5'er mL dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda veya mikrodalga fırında kaynatılarak yapılabilir. Sterilizasyon sonrası 25 ^{o}C'de pH'sı 7.4±0.2'dir. FVRB agar besiyerinin aşırı ısıtılmasından kaçınılmalıdır. Aşırı ısıtma selektiviteyi azaltır. Hazırlanmış besiyeri parlak ve koyu kırmızı renklidir.

9 Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535)

Mikrobiyolojik analizlerde seyreltme çözeltisi olarak kullanılır. Damıtık su içinde 9.5 g/L olacak şekilde hazırlanır. Deney tüplerine 9'ar mL dağıtılıp, otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 ^{o}C'de pH'sı 7.0±0.2'dir. Kullanıma hazır çözelti berrak ve renksizdir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hilal SELAMOĞLU
Doğum Yeri : Kırşehir
Doğum Tarihi : 29.10.1987
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Hacı Fatma Erdemir Anadolu Lisesi (2005)
Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2011)
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum ve Yılı

Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Mamülleri Fabrikası (Kasım 2012-Mayıs 2017)

Bilimsel Çalışmaları

Selamoğlu H., Halkman K. 2016. Gıda Maddelerinde Salmonella Aranmasında Laktoz Broth ve Tamponlanmış Peptonlu Su ile Önzenginleştirme Süresinin Karşılaştırılması. (BAP Projesi/Araştırmacı)

Çilak G., **Selamoğlu H.**, Dülger D., Kurukama F., Çağlar C., Assylbekov D., Halkman K. 2015. Hızlı *Escherichia coli* Tanımlanmasında Ultraviyole Destekli İndol ve MUG Esaslı Testlerin Kıyaslanması, Gıda Dergisi, Cilt 41(2), 85-90.

Emin, E.N., Halkman, K., Çilak, Ö.G., Bahar, H., Yavuz, Ü.B., Bostan, S., **Selamoğlu, H.** 2015. Coliform Content of The Food Sold in Traditional Turkish Grocery Bazaars. 3th International Syposium on Traditional foods from Adriatic to Caucasus 1-4 Ekim 2015. Bosna- Hersek.

Çilak, Ö.G., **Selamoğlu, H.**, Aybakır, Y.M., Savran, D., Halkman K. 2015. A study on Tarhana-Microbial Load. 3th International Syposium on Traditional foods from Adriatic to Caucasus, 1-4 Ekim 2015. Bosna- Hersek.

Çetinkaya, A., **Selamoğlu, H.** 2014. Microbiological Quality of Kars Gruyere Cheese. 2nd International Congress on Food Technology, 05-07 Kasım 2014. Kuşadası/Aydın, Türkiye.

Günalp, B., Şişman, F.İ., **Selamoğlu, H.**, Çilak, Ö.G. 2013. Ticari ve Ev Yapımı Mayonezlerin Mikrobiyel Yük Değişiminin Karşılaştırılması. Türkiye Gıda ve İçecek Sanayii Dernekleri Federasyonu (TGDF) Gıda Kongresi, 12-14 Kasım 2013 Side/Antalya, Türkiye.

Çilak, Ö.G., **Selamoğlu, H.**, Orhan, E. 2013. The Microbiological and Sensory Quality of Chickpeas Before and After Roasting; A Traditional Snack Food "Leblebi". 2th International Symposium on Traditional foods from Adriatic to Caucasus, 24-26 Ekim 2013, Ohrid, Makedonya.