

Açıkta Satılan Baharatlarda Escherichia Coli O157:H7 ve Salmonella Spp. Varlığının Moleküler Mikrobiyolojik Analiz Yöntemi ile Belirlenmesi

Detection of Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella SPP. in Unpackaged Spices by Molecular Microbiological Analysis Method

Mevlüde Kızıl¹, Nagham Wassouf¹, M. Merve Tengilimoğlu Metin¹, Damla Gümüş¹, Derya Dikmen¹, M. Fatih Uyar¹

¹ Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, açıkta satılan karabiber, kırmızıbiber, kimyon ve sumakta E. coli O157:H7 ve Salmonella spp. varlığının moleküler mikrobiyolojik yöntemle teşhis edilmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Örneklerin toplanması için Türkiye'nin yedi farklı bölgesini temsilen iller seçilmiş (İstanbul, İzmir, Ankara, Adana, Samsun, Gaziantep ve Erzurum) ve her ilde üç farklı dükkandan en az 200 g olacak şekilde toplam 84 karabiber, kırmızıbiber, kimyon ve sumak örnekleri satın alınmıştır. Baharatın satışa sunulduğu ortamın sıcaklık ve nem ölçümleri kaydedilmiştir. Ayrıca baharatın nem içeriği de nem analizörü ile belirlenmiştir. E. coli O157:H7 ve Salmonella spp. varlığı analizi ise Foodproof E.coli O157:H7 ve Salmonella spp. analiz kitleri kullanılarak Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile gerçekleştirilmiştir. **Bulgular:** Hiçbir örnekte E. coli O157:H7 saptanmazken, Salmonella spp. İstanbul'dan alınan bir karabiber örneğinde, İzmir'den alınan bir karabiber örneğinde ve Samsun'dan alınan 3 kırmızıbiber ve 2 sumak örneklerinde saptanmıştır. Patojen bakterilerin teşhisinde kullanılan geleneksel yöntem ile sonuç 3-4 gün içerisinde alınırken, RT-PCR ile yapılan analizde ön zenginleştirme dahil, E.coli O157:H7 analizi yaklaşık 20 saatte (18 saat ön zenginleştirme, 1 saat DNA ekstraksiyonu ve 1 saat RT-PCR analizi), Salmonella spp. analizi yaklaşık 38 saatte (36 saat ön zenginleştirme, 1 saat DNA ekstraksiyonu ve 1 saat RT-PCR analizi) gerçekleştirilmiştir. **Sonuç:** Bu çalışma, besin güvenliğini ve insan sağlığını tehdit eden patojen bakterilerin RT-PCR ile hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenebileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: E. coli O157:H7, Salmonella spp., baharat, RT-PCR

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to detection of the presence of E. coli O157:H7 and Salmonella spp. in unpackaged spices by molecular microbiological analysis method. **Materials and Methods:** In order to collect samples, seven cities were selected which could represent the seven geographical regions of Turkey and at least 200 g black pepper, red pepper, cumin and sumac samples were purchased from three different retail shops in each city. Retail shops' temperature and humidity were measured. Moreover, the moisture of spices was measured by moisture analyzer. The presence of E. coli O157:H7 and Salmonella spp. were carried out using Foodproof E. coli O157:H7 and Salmonella spp. analysis kits by Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Results:** E. coli O157:H7 was not detected in any of the samples whereas, Salmonella spp. were detected in one black pepper sample of Istanbul, one black pepper sample of Izmir, three red pepper samples and two sumac samples of Samsun. While conventional methods for detection of Salmonella spp. and E. coli O157:H7 in food requires 3-4 days to obtain the results, in this study the analysis duration by RT-PCR was 20 hours for E. coli O157:H7 (18 hours for pre-enrichment, 1 hour for DNA extraction and 1 hour PCR) and 38 hours for Salmonella spp. (36 hours for pre-enrichment, 1 hour for DNA extraction and 1 hour PCR). **Conclusion:** This study shows that pathogens, which threaten health and food safety, can be detected quickly and reliably by RT-PCR.

Keywords: E. coli O157:H7, Salmonella spp., spice, RT-PCR

İletişim/Correspondence:

Yrd. Doç. Dr. Mevlüde Kızıl

Adres: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü 06100 Ankara, Türkiye

E-posta: mkizil@hacettepe.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 09.11.2015

Kabul tarihi/Accepted: 16.12.2015

GİRİŞ

Baharat, sıcak ve nemli bölgelerde yetiştirilmekte ve bitkilerin kök, yumru, yaprak, çiçek, meyve veya tohum gibi kısımlarından elde edilmektedir (1-4). Baharat, lezzet, renk ve aroma verici özelliklerinden dolayı tüm dünyada yiyecek hazırlamada yaygın olarak kullanılmaktadır (5,6). Lezzet ve aroma verici özelliklerinin yanı sıra fenolik asitler, flavonoidler, steroller ve kumarinler gibi insan sağlığını olumlu yönde etkileyen biyoaktif bileşikler de içermektedir (7). Ancak baharat toplanma, işlenme ve depolanma aşamaları sırasında insan sağlığını tehdit edebilen mikrobiyal kontaminasyona maruz kalabilmektedir (8). Ayrıca, market ve pazarlarda ambalajsız açıkta satılan baharat toz, atık su, hayvan/insan dışkısı, kemirgen ve böceklerle kontamine olabilmektedir. Özellikle patojen bakteri ile kontamine olan baharat besinlere eklendiğinde besin kaynaklı hastalıklar için birincil kaynak olmaktadır (9).

Besin kaynaklı hastalıklar, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülen ve giderek büyüyen bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada her yıl milyonlarca insanın besin kaynaklı hastalıklara yakalandığı, hatta bu hastalıkların bir kısmının ölümle sonuçlandığı belirtilmektedir (8,10). Besin kaynaklı hastalıklar, zararlı bakteri, parazitler, virüs ya da kimyasal maddeler içeren herhangi bir yiyecek ya da içecek tüketildiği zaman oluşmaktadır ve yaklaşık %20'sinin yetersiz hijyen nedeniyle olduğu bildirilmektedir (11,12). Yirminci yüzyılın son on yılı içinde, birçok Avrupa ülkesinde baharattan dolayı gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve besin zehirlenmeleri oranının arttığı bildirilmiştir (8,13). Baharatın, dünyanın farklı tarım alanlarında özellikle, gıda güvenliği uygulamalarının düşük olduğu ülkelerde daha sıklıkta yetiştirilmesi besin zehirlenmelerindeki artışla ilişkili olabilmektedir (6,14).

Salmonella, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens ve Bacillus cereus gibi besin kaynaklı hastalıklara neden olan bakteriler, baharatın üretim ve dağıtım aşaması süreçlerinde hijyen kuralları iyi ve doğru uygulanmazsa bulaşa neden olabilmektedir (6,15-18). Bu patojenler insanlarda besin kaynaklı

enfeksiyonlara ve intoksikasyonlara neden olabilmektedir (8,10). Özellikle, salmonellozis önemli bir besin kaynaklı hastalık olarak değerlendirilirken, diğer yandan son 20 yılda dünyada besin kaynaklı enfeksiyon salgınlarının birçoğundan E. coli O157:H7 serotipinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (10). Avrupa ve Amerika'da kontamine baharat nedeniyle oluşan besin zehirlenmeleri ve intoksikasyonların sayısının giderek arttığı belirtilmiş ve besin zehirlenmelerinin önüne geçilebilmesi adına bu patojenlere yönelik hızlı teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği vurgulanmıştır (8).

Besinlerde patojen bakterilerin teşhisinde geleneksel yöntemler kullanıldığında patojen bakterilerin teşhisi için en az üç gün gerekmektedir. Ancak besin zehirlenmelerinin önüne geçilebilmesi açısından yeterince hızlı olamamaktadır (19). Analizi hızlandırmak amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) sıklıkta kullanılmaktadır (19). Son yıllarda RT-PCR ile çok sayıda önemli patojen bakteri tanımlanmıştır (20,21). Ayrıca bu yöntem daha duyarlı ve özgül olmasının yanı sıra, doğru miktar ölçümünü ve tespitini sağlamaktadır (22). Türkiye'de baharatın mikrobiyal yükü ile ilgili çalışmalar sınırlıdır ve hemen hemen hepsi geleneksel mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak yürütülmüştür. Bu çalışmada, Türkiye'nin yedi bölgesini temsilen, yedi şehirde (İstanbul, İzmir, Ankara, Adana, Samsun, Gaziantep ve Erzurum) ambalajsız açıkta satılan kırmızıbiber, karabiber, kimyon ve sumak gibi baharatda E. coli O157:H7 ve Salmonella spp. varlığının moleküler mikrobiyolojik analiz yöntemi kullanılarak teşhis edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Toplanması

Türkiye'nin 7 bölgesini temsilen 7 şehirde (İstanbul, İzmir, Ankara, Adana, Samsun, Gaziantep ve Erzurum) ambalajsız açıkta satılan kırmızı biber, karabiber, kimyon ve sumak örnekleri rasgele olarak üç farklı dükkandan, her bir örneğin ağırlığı en az 200 g olacak

şekilde satın alınmıştır. Yedi bölgeyi temsilen 7 şehrin seçimi, şehrin Büyükşehir olması, nüfus yoğunluğu, şehirde yaşayanların alışkanlıklarına göre yüksek baharat tüketim durumları göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler 2014 yılı Mayıs-Haziran ayları arasında toplanmıştır.

Sıcaklık ve Nem Ölçümleri

Baharatın satıldığı ortamın sıcaklık ve nem ölçümleri her bir dükkanın orta noktasında termometre ve higrometre özelliği olan cihazın çalıştırılmasıyla elde edilmiştir. Her dükkandan toplanan yaklaşık 200 g baharat örnekleri steril numune poşetlerine alınarak Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Besin Mikrobiyolojisi Laboratuvarına taşınmış ve baharatın nem ölçümleri, Sartorius MA 150® cihazı ile mümkün olan en kısa zamanda gerçekleştirilmiştir. Nem ölçümlerinden sonra mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilene kadar örnekler -20oC'de saklanmıştır.

Ön Zenginleştirme Prosedürleri

Ön zenginleştirme işlemleri moleküler mikrobiyolojik analizler öncesinde gerçekleştirilmiştir. Her iki bakteri için ön zenginleştirme prosedürleri aşağıda detaylı olarak belirtilmektedir.

E.coli O157:H7 Ön Zenginleştirme Prosedürü: 25'er g örnek %0.2 Novobiocin içeren 225 mL mTryptic-Soy-Broth (m-TSB) ile 40oC'de 18 saat inkübe edilmiştir. m-TSB besiyeri 33 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilerek hazırlanmış ve otoklavda 121oC'da 15 dakika sterilize edilmiştir (23).

Salmonella spp. Ön Zenginleştirme Prosedürü: 25'er g örnek 225 ml (seçici olmayan besiyeri) Buffered Peptone Water (BPW) ile 37oC'de 16-18 saat inkübe edildikten sonra kültürden 1 mL alınıp Novobiocin içeren 10 mL Muller Kauffmann Tetrathionate Broth (MKTT-n) seçici besiyerinde 37oC'de 20 saat inkübe edilmiştir. BPW, uygun kaplarda dehidre besiyeri 25.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilerek hazırlanmış ve otoklavda 121oC'da 15 dakika sterilize

edilmiştir. MKTT-n, uygun kaplarda dehidre besiyeri 89.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilerek hazırlanmış, 5 dakika kaynatılıp hızla soğutulmuştur. Bazal besiyerine iyot/potasyom iyodür çözeltisi ilave edildikten sonra steril tüplere aktarılıp aynı gün kullanılmıştır (24).

DNA İzolasyonu

Baharat örnekleri E. coli O157:H7 ve Salmonella spp. için özel seçici besiyerinde inkübe edildikten sonra, High Pure Foodproof I DNA Isolation Kiti ile DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (25).

Buna göre 1 mL örnek reaksiyon tüpüne alındıktan sonra 5000'g de 1 dakika santrifüj edilmiş (Labnet, C2500, ABD) ve supernatantı alındıktan sonra 200 µL Liziz Buffer eklenmiş ve örnekler vorteks yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler 10 dk 95 0C'de kuru ısıda bekletilmiş ve sonrasında 12000 g de 1 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant başka bir reaksiyon tüpüne alınıp 300 µL Binding Buffer ile karıştırılıp filtreli tüplere alınmıştır. Ardından 5000g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında 450 µL Washer Buffer ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra daha önceden 70°C'ye ısıtılan 50 µL Elution Buffer eklenerek 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 5000g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra DNA izolasyon işlemi tamamlanmıştır (25).

Real-Time PCR Analizi

Analiz Foodproof E. coli O157:H7 Detection Kit ve Foodproof Salmonella spp. analiz kitlerinde belirtilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Bir örnek için reaksiyon tüpüne 18µL master mix, 1µl enzim, 1µl internal kontrol alınarak toplam 20 µL'lik karışım elde edilmiştir. Bu karışım 96 kuyucuklu plakaya her bir örnek, negatif kontrol ve pozitif kontrol için 20 µl konulduktan sonra, üzerine 5 µl örnek DNA'sı, negatif kontrol için 5 µl su ve pozitif kontrol için 5 µl E. coli O157:H7 veya Salmonella spp. DNA'sı konulmuş ve analiz edilmiştir (25).

Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin

istatistiksel değerlendirilmesi, Windows işletim sisteminde SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Nem ve sıcaklık verilerinde tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma kullanılmıştır. Türkiye'nin Marmara, Ege, İç Anadolu, Akdeniz, Karadeniz, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerini temsilen belirlenen 7 ilden alınan örneklerin satıldığı dükkanın sıcaklığı, nemi ve baharatın nem içerikleri arasında fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Hangi illerin birbirinden farklı olduğu ise post-hoc Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Tüm istatistiksel testler sonucunda $p < 0.05$ istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir (26).

BULGULAR

Nem ve Sıcaklık Ölçümleri

Türkiye'de açıkta satışa sunulan baharat örneklerinin nem değeri ile satışın yapıldığı ortamın sıcaklık ve nem düzeyleri ölçülmüş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Baharatın satışa sunulduğu ortamın ortalama sıcaklığı İstanbul, İzmir, Ankara, Adana, Samsun, Gaziantep ve Erzurum'da sırasıyla 28.3 ± 1.25 , 28.9 ± 1.05 , 25.5 ± 0.81 , 31.3 ± 1.33 , 26.4 ± 1.1 , 20.9 ± 0.0 , 24.8 ± 0.32 °C olarak bulunmuştur. Ortalama nem düzeyi ise %29.7 ile %56.7 aralığında saptanmıştır. Baharatın nem içeriğinin ise %6.9 ile %22.2

Tablo 1. Baharat örneklerinin satın alındığı ortamın ortalama sıcaklık (°C), nem ölçümleri ve baharatın nem değerleri ($\bar{x} \pm S$)

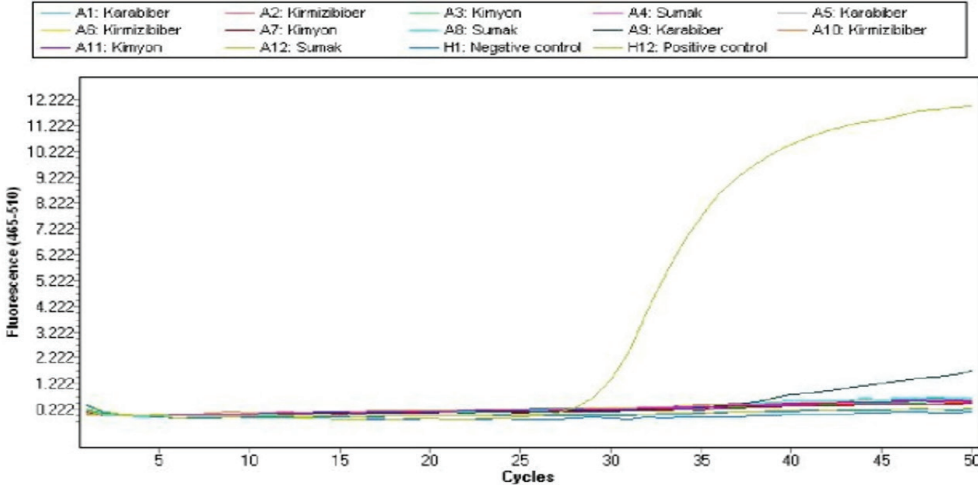
	İstanbul	İzmir	Ankara	Adana	Samsun	Gaziantep	Erzurum	p
Ortam sıcaklığı	28.3 ± 1.25^b	28.9 ± 1.05^b	25.5 ± 0.81^c	31.3 ± 1.33^a	26.4 ± 1.1^c	20.9 ± 0.0^d	24.8 ± 0.32^c	<0.001
Ortam nemi	47.9 ± 0.095^b	37.9 ± 1.15^d	41.2 ± 3.15^{cd}	49 ± 4.22^b	56.7 ± 4.35^a	44.8 ± 3.0^{bc}	29.7 ± 2.56^e	<0.001
Karabiber	10.6 ± 1.27	10.6 ± 0.88	11.2 ± 0.8	11 ± 0.8	11 ± 2.29	11.3 ± 0.99	11.2 ± 1.32	>0.05
Kırmızı biber	10.8 ± 1.81^{ab}	13.5 ± 2.18^{bc}	13.8 ± 3.59^{bc}	16.7 ± 2.28^c	10.2 ± 1.6^{ab}	10 ± 1.7^{ab}	8.7 ± 1.37^a	<0.01
Kimyon	6.9 ± 0.73	7.5 ± 1.53	7.3 ± 0.43	7.9 ± 0.78	7.9 ± 0.63	7.6 ± 0.79	6.9 ± 1.14	>0.05
Sumak	11.8 ± 6.61	15.2 ± 7.83	16.4 ± 7.1	22.2 ± 0.51	16.5 ± 7.18	18.8 ± 8.86	16.7 ± 6.47	>0.05

Kolonlar arasında farklı harf taşıyanlar istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.01$).

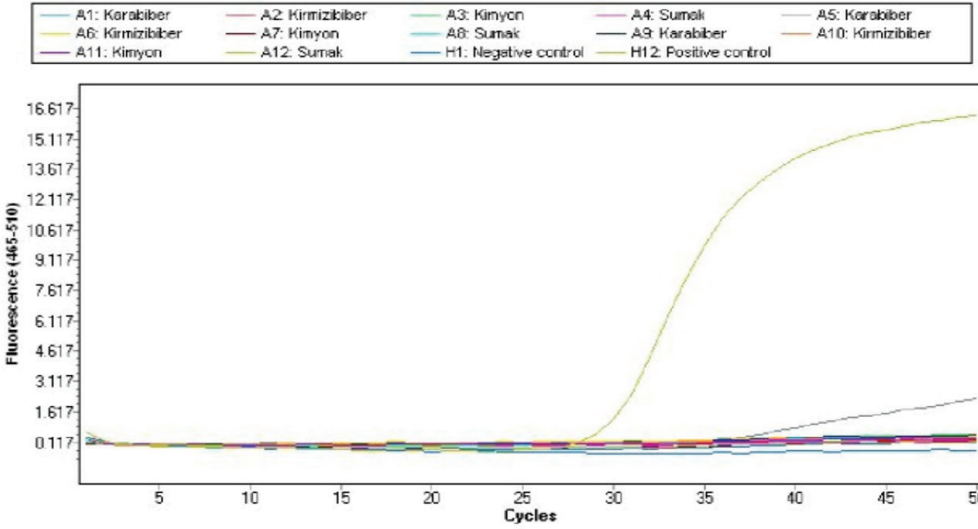
Tablo 2. Baharatda E.coli O157:H7 ve Salmonella spp. varlığı

Şehir	Baharat	A*		B*		C*	
		E.coli O157:H7	Salmonella spp.	E.coli O157:H7	Salmonella spp.	E.coli O157:H7	Salmonella spp.
İstanbul	Karabiber	-	-	-	+	-	-
	Kırmızı biber	-	-	-	-	-	-
	Kimyon	-	-	-	-	-	-
	Sumak	-	-	-	-	-	-
İzmir	Karabiber	-	-	-	+	-	-
	Kırmızı biber	-	-	-	-	-	-
	Kimyon	-	-	-	-	-	-
	Sumak	-	-	-	-	-	-
Ankara	Karabiber	-	-	-	-	-	-
	Kırmızı biber	-	-	-	-	-	-
	Kimyon	-	-	-	-	-	-
	Sumak	-	-	-	-	-	-
Adana	Karabiber	-	-	-	-	-	-
	Kırmızı biber	-	-	-	-	-	-
	Kimyon	-	-	-	-	-	-
	Sumak	-	-	-	-	-	-
Samsun	Karabiber	-	-	-	-	-	-
	Kırmızı biber	-	+	-	+	-	+
	Kimyon	-	-	-	-	-	-
	Sumak	-	-	-	+	-	+
Gaziantep	Karabiber	-	-	-	-	-	-
	Kırmızı biber	-	-	-	-	-	-
	Kimyon	-	-	-	-	-	-
	Sumak	-	-	-	-	-	-
Erzurum	Karabiber	-	-	-	-	-	-
	Kırmızı biber	-	-	-	-	-	-
	Kimyon	-	-	-	-	-	-
	Sumak	-	-	-	-	-	-

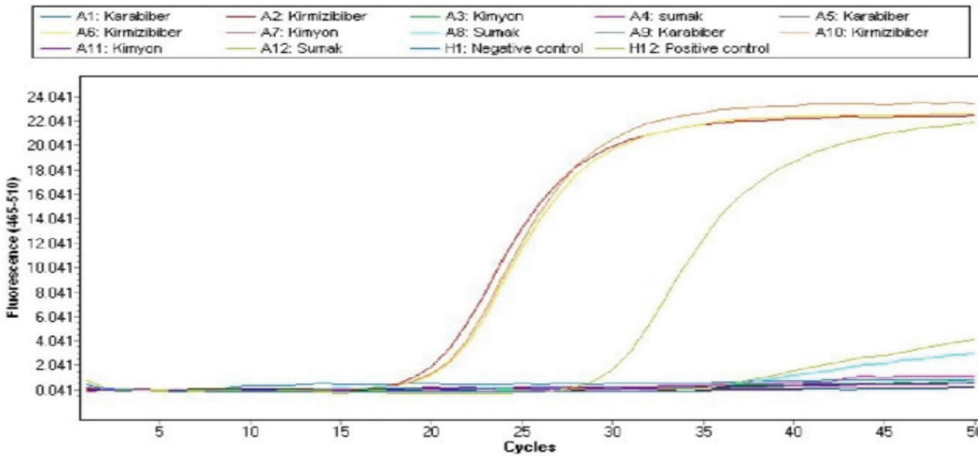
*Örneğin toplandığı 1. dükkan:A, 2. dükkan:B, 3. dükkan:C şeklinde kodlanmıştır.



Şekil 1. İstanbul için Real-Time PCR'da elde edilen *Salmonella* spp. analizinin amplikasyon eğrisi



Şekil 2. İzmir için Real-Time PCR'da elde edilen *Salmonella* spp. analizinin amplikasyon eğrisi



Şekil 2. İzmir için Real-Time PCR'da elde edilen *Salmonella* spp. analizinin amplikasyon eğrisi

arasında değiştiği görülmüştür. Çalışmadan elde edilen verilere göre, ortamın sıcaklığı, ortamın nemi ve kırmızı biberin nem düzeyi illere göre istatistiksel açıdan farklılık göstermiştir ($p<0.01$). Baharatın satışa sunulduğu ortam sıcaklığının en yüksek olduğu il Adana, satışa sunulduğu ortam neminin en yüksek olduğu il Samsun, en yüksek nem içeriğine sahip olan baharat ise sumak olarak belirlenmiştir.

Tablo 1’de baharatın satıldığı ortamın sıcaklık ve nem düzeyleri ile baharatın nem içerikleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

E.coli O157:H7 ve Salmonella spp Varlığı

Türkiye’nin 7 ilinden 3’ünde (İstanbul, İzmir, Samsun) ambalajsız açıkta satılan baharatda moleküler mikrobiyolojik yöntemlerle Salmonella spp. varlığı tespit edilirken, E. coli O157:H7 varlığına rastlanmamıştır. İstanbul ve İzmir iline ait birer karabiber örneğinde, bunun yanı sıra Samsun iline ait kırmızıbiber ve sumak örneklerinde Salmonella spp. tespit edilmiştir. Yedi ilden toplanan karabiber, kırmızıbiber, kimyon ve sumak örneklerinin E.coli O157:H7 ve Salmonella spp varlığına yönelik veriler Tablo 2’de ayrıntılı olarak yer almaktadır. İstanbul, İzmir ve Samsun illerinden Salmonella spp pozitif örneklerin amplikasyon eğrileri Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3’de sırasıyla verilmiştir.

TARTIŞMA

Pazarlarda ve marketlerde açıkta satılan baharat hem tozla temas halindedir, hem de kemirgen, kuş ve böcek feçesine maruz kalabilmektedir. Bu durum baharatın E. coli, Salmonella spp., B. cereus, C. perfringens gibi patojen mikroorganizmalar ile kontaminasyonuna neden olabilmektedir. Kontamine olmuş baharat besinlere katıldığı zaman bakteriler besinlere geçerek besin zehirlenmelerine neden olmakta ve sağlık üzerinde tehlike oluşturmaktadır (6).

E. coli O157:H7 ve Salmonella spp. varlığını saptamak için kullanılan klasik mikrobiyolojik yöntem en az 3-4 gün sürerken, RT-PCR ile ön zenginleştirme dahil yaklaşık 20 saatte (18 saat ön zenginleştirme, 1 saatte DNA izolasyonu,

1 saatte PCR) sonuç alınabilmektedir. Ayrıca, konvansiyonel kültür bazlı veya immünojenik bazlı test yöntemlerine göre RT-PCR yöntemi yüksek duyarlılık, düşük bulaşma riski, performans ve hız kolaylığı gibi olumlu özelliklere sahiptir (27). Bu çalışmada da RT-PCR kullanılarak moleküler mikrobiyolojik analiz ile E. coli O157:H7 ve Salmonella spp. varlığı analiz edilmiş, E. coli O157:H7 varlığı analizi ön zenginleştirme işlemi dahil olmak üzere yaklaşık 20 saatte gerçekleştirilmiştir. Salmonella spp. varlığı tespitinde, Muller Kauffmann Terathionate Broth (MKTTn) zenginleştirme besiyeri kullanılmadan önce hasar görmüş olabilen bakteri DNA’sının iyileştirilmesi amacıyla peptonlu suda 16 saat inkübe edilmiştir. Bu nedenle Salmonella spp. varlığı tespiti yaklaşık 38 saatte gerçekleştirilmiştir. Bu bilgiler dikkate alındığında moleküler mikrobiyolojik analizin klasik yöntemle kıyaslandığında daha hızlı olduğu görülmektedir.

Baharat Örneklerinde E. coli O157: H7 Varlığı

Bu çalışmada, Türkiye’nin 7 bölgesini temsilen 7 ilden toplanan toplam 84 baharat örneğinde moleküler mikrobiyolojik analiz yöntemi ile E. coli O157:H7 varlığı saptanmamıştır. Bu çalışmaya benzer olarak, moleküler mikrobiyolojik analiz yöntemi kullanılarak İzmir’de satışa sunulan 66 farklı baharat örnekleri analiz edilmiş ve örneklerin hiçbirinde E. coli O157:H7 varlığı tespit edilmemiştir (23). Ankara’da geleneksel mikrobiyolojik yöntem kullanılarak yapılan bir çalışmada, karabiber, toz kırmızı biber ve kimyon örneklerinin hiçbirinde E. coli izole edilmemiştir (15). Benzer olarak, Tekirdağ’da ambalajlı, ambalajsız, ışınlanmış 33 farklı baharat örneğinde (toz karabiber, kırmızı pul biber, toz kırmızı biber ve toz tarçın) E. coli varlığına rastlanmamıştır (28). Buna karşın, Türkiye’de et ve et ürünleri üretiminde kullanılan baharat örneklerinin incelendiği bir çalışmada, 420 baharat örneğinden 19’unda (10 kırmızı biber, 1 karabiber, 2 kimyon, 5 kişniş, 1 yenibahar) E. coli bulunduğu rapor edilmiştir (29).

Yurtdışında baharatın mikrobiyolojik yükleri üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde,

İspanya'da yapılan çalışmada 53 baharat örneğinin hiçbirinde bu çalışmaya benzer olarak *E. coli* O157:H7 saptanmamıştır (13). Diğer yandan, İran'da Salari ve arkadaşları (1), 36 kırmızı biber örneklerinde *Salmonella* spp. saptanmaz iken *E. coli*'nin tehlikeli düzeylerde bulunduğunu bildirmişlerdir.

E. coli varlığı, fekal kontaminasyonun ve olası enterik patojenlerin varlığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (30). Bu çalışmada, baharatın *E. coli* miktarının belirlenmesi yerine en tehlikeli serotipi olarak bilinen *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi amaçlandığı için baharatın *E. coli* yükü hakkında bir sonuç elde edilmemiştir. Hiçbir baharat örneğinde *E. coli* O157:H7 varlığının tespit edilmemesi, *E. coli* içermediğini göstermemektedir. Ozkizilcik ve arkadaşlarının (23) yaptığı önceki çalışmada belirtildiği gibi, 2002 yılında yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği'ne göre, *E. coli* için bulunabilecek maksimum limit 1.0×10^1 olarak belirlenirken *E. coli* O157:H7'nin 25 g örnekte bulunmaması gerektiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, Türkiye'nin 7 bölgesini temsilen 7 ilden satın alınan karabiber, kırmızıbiber, kimyon ve sumak örneklerinin hiçbirinde *E. coli* O157:H7 varlığı saptanmamıştır. Bu sonuç baharat örneklerinin 2002 yılında yayımlanan Tebliğ'e uygun olduğunu göstermektedir. Fakat 2010 ve 2011 yıllarında revize edilen Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre (31,32), baharatta *E. coli* O157:H7 bakterisi için analiz yapılması zorunluluk değildir ve bu bakteri için herhangi bir sınırlama da getirilmemiştir. Aslında, *E. coli* O157:H7 biyoterörizm açısından B sınıfında değerlendirilmektedir ve bu patojen bakteri hemorajik diyareye neden olarak tüm dünyada ölümlere varan tehlike oluşturmaktadır ve insandan insana çok hızlı bir şekilde yayılabilmektedir (33). Baharat gıda endüstrisinde birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle et ve et ürünleri gibi potansiyel riskli besinlere eklenmesi tehlikenin boyutunu artırıcı bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm bunlar göz önüne alındığında Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde baharatta *E. coli* O157:H7 için sınırlama getirilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Baharat Örneklerinde *Salmonella* spp. Varlığı

Bu çalışmada, RT-PCR ile analiz edilen 84 baharat örneğinin 7'sinde (2 karabiber, 3 kırmızı, 2 sumak) *Salmonella* spp. tespit edilmiştir. Karabiber örneklerinin %9.5'inde (2/21 örnek) *Salmonella* spp. saptanmıştır. Bu çalışmayı destekleyici sonuçlar Moreira ve arkadaşları (17) tarafından da rapor edilmiş, en yüksek kontaminasyon düzeyinin karabiberde olduğu bulunmuş ve analiz edilen karabiber örneklerin %18.2'sinde (12/66 örnek) *Salmonella* spp. saptanmıştır.

Bu çalışmada analiz edilen 21 kırmızı biber örneğinin 3'ünde (%14.3) *Salmonella* spp. saptanmıştır. Salari ve arkadaşları (1) ise 36 kırmızıbiber örneğinde *Salmonella* spp. saptayamazken, *E. coli*'nin tehlikeli düzeyde saptandığını bildirmiştir.

Sumağın mikrobiyolojik yükünü inceleyen az çalışma vardır. Elmalı ve Yaman (34) yaptıkları çalışmada sumak örneklerinde *E. coli* saptarken, *Salmonella* spp. varlığına rastlamamışlardır.

Bu çalışmada analiz edilen 21 kimyon örneklerinin hiç birisinde *E. coli* O157:H7 ya da *Salmonella* spp. saptanmamıştır. Moriera ve arkadaşları (17) ve Donia (35) tarafından kimyonda *Salmonella* belirlenirken, Üner ve Ergün (36) ve Erou ve arkadaşları (15) kimyon örneklerinin hiç birisinde *E. coli* ya da *Salmonella* spp. saptamamışlardır. Yapılan çalışmalarda, kimyonun patojen mikroorganizmalara karşı güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (37-39). Buna karşın, Holley ve Patel (40) tarafından yapılan çalışmada, karabiber ve kırmızı biberin baharat arasında antibakteriyel özelliklerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler, yapılan bu çalışmayı destekler niteliktedir. Kimyonda, *Salmonella* spp. ve *E. coli* O157:H7 saptanmama nedeninin kimyonun güçlü antimikrobiyal veya antibakteriyel aktivitesi olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada *Salmonella* spp. 2 karabiber, 3 kırmızıbiber, 2 sumak örneğinde saptanmıştır. Fakat 2013 yılında yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliğine (3) göre ve 2011 yılında yayımlanan Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne (32) göre baharatın 25g'ında *Salmonella* spp.

bulunmaması gereklidir. Buna göre, İstanbul'un karabiber örneği, Samsun'un kırmızı biber ve sumak örneği ve İzmir'in karabiber örneği 2013 yılında yayımlanan Tebliğlere göre Salmonella spp. yönünden uyumsuzdur.

Her bir baharatın nem içeriği ile Salmonella spp. varlığı arasında direk bir ilişki saptanmamıştır. Fakat Samsun en yüksek ortam nemine sahip il olarak belirlenmiş ve Salmonella spp. içeren örneklerin %71'ini Samsun'dan alınan örnekler oluşturmuştur. Dolayısıyla, saklama koşullarının ve baharatın bulunduğu ortamın neminin Salmonella spp. gibi patojen bakteri varlığı üzerinde etkisi olabilmektedir. Bunun için saklama koşullarının besin güvenliğini bozmayacak özellikte olması gerekmektedir.

Salmonella spp. aynı E. coli O157:H7 gibi geniş bir nüfusun sağlığını tehdit edebilecek boyutta olması nedeniyle B sınıfında biyolojik tehlike olarak gösterilmektedir. Bu nedenle besinlerdeki analizi, besin güvenliğinin sağlanması ve gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir.

Bu çalışma, besin güvenliğini ve insan sağlığını tehdit patojen bakterilerin RT-PCR ile hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenebileceğini göstermektedir. Moleküler mikrobiyolojik yöntem ile patojen bakteri canlı veya ölü bir şekilde saptanabilmektedir. Böylece, baharat gibi birçok aşama kaydederek soframıza ulaşan besinlerde oluşabilen bir bulaş kolaylıkla ortaya konulabilir.

Çıkar çatışması/Conflict of interest: Yazarlar ya da yazı ile ilgili bildirilen herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Maddi destek/Funding: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 013D02401001).

KAYNAKLAR

1. Salari RN, Habibi Najafi MB, Boroushaki MT, Mortazavi SA, Fathi Najafi M. Assessment of the microbiological quality and mycotoxin contamination of Iranian red pepper spice. J Agr Sci Tech 2012;14:1511-1521.
2. Demircioğlu Y, Yaman M, Şimşek I. Kadınların baharat kullanım alışkanlıkları üzerine bir araştırma. Türk Silahlı Kuvvetleri Koruyucu Hekimlik Bülteni 2007;6:161-168.
3. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği, Tebliğ No (2013/12). Resmi Gazete: 10.04.2013-28614. Erişim: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/04/20130410-19.htm>. Erişim tarihi: 03 Ekim 2015.
4. Ağaoğlu S, Dostbil N, Alemdar S. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bull Vet Inst Pulawy 2007;51:53-57.
5. Rahman MSA, Thangaraj S, Salique SM, Khan KF, Natheer SE. Antimicrobial and biochemical analysis of some spices extract against food spoilage pathogens. Int J Food Safety 2010;12:71-75.
6. Banerjee M, Sarkar PK. Microbiological quality of some retail spices in India. Food Res Int 2003;36:469-474.
7. Viuda-Martosa M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Spices as Functional Foods. Crit Rev Food Sci Nutr 2011;51:13-28.
8. Schweiggert U, Carle R, Schieber A. Conventional and alternative processes for spice production – a review. Trends in Food Sci Technol 2007;18: 260-268.
9. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health. Foodborne Illnesses. Available at: http://digestive.niddk.nih.gov/ddiseases/pubs/bacteria/Bacteria_Foodborne_508.pdf. Accessed October 2015
10. WHO. 10 Facts on Food Safety. Available at: http://www.who.int/features/factfiles/food_safety/facts/en/index.html. Accessed October 2015
11. U.S.FDA. Safe Food Handling. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Food/ResourcesForYou/Consumers/UCM257049.pdf>. Accessed October 2015
12. Bilici S. Toplu Beslenme Sistemleri Çalışanları için Hijyen El Kitabı [Elektronik Sürüm]. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Obezite Diyabet ve Metabolik Hastalıklar Dairesi Başkanlığı, Ankara, 2012.
13. Sospedra I, Soriano JM, Manes J. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs commercialized in Spain. Plant Foods Hum Nutr 2010;65:364-368.
14. Witkowska AM, Hickey DK, Alonso-Gomez M, Wilkinson MG. The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. Food Control 2011;22:616-625.
15. Erou İ, Küplülü Ö, Göz SK. Ankara 'da tüketime sunulan bazı baharatın mikrobiyolojik kalitesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1999;46:115-125.
16. Aguilera MO, Stagnitta PV, Micalizzi B, Stefanini de Guzmán AM. Prevalence and characterization of Clostridium perfringens from spices in Argentina. Anaerobe 2005;11:327-334.
17. Moreira PL, Lourenco TB, Pinto JP, Rall VL. Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, Sao Paulo, Brazil. J Food Prot 2009;72:421-424.
18. Keller SE, VanDoren JM, Grasso EM, Halik LA. Growth and survival of Salmonella in ground black pepper (Piper nigrum). Food Microbiol 2013;34:182-188.
19. Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M. (2006) Real-time PCR for the detection of Salmonella spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. J Microbiol Methods 2006;66:538-547.

20. Günel T, Aydın K. Real-Time PCR and applications area. *Turkish Journal of Scientific Reviews* 2009;2:43-45.
21. Zhu P, Shelton DR, Li S, Adams DL, Karns JS, Amstutz P et al. Detection of *E. coli* O157:H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay. *Biosens Bioelectron* 2011;30:337-341.
22. Niemira BA, Zhang. Advanced Technologies for Detection and Elimination of Pathogens. In: Gerald MS, Ethan BS, Karl RM, editors. *The Produce Contamination Problem San Diego: Academic Press; 2009. p. 425-443.*
23. Ozkizilcik A, Ateş M, Cerci B. Comparison of real-time PCR and conventional cultural methods to detect *Escherichia coli* O157:H7 in spices in Turkey. *IUFS Journal of Biology* 2012;71:113-120.
24. Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control* 2015;47:264-276.
25. McGuinness S, Barry T, O'Grady J. Development and preliminary validation of a real time TR-PCR based method targeting tmRNA for rapid and specific detection of *Salmonella*. *Food Res Int* 2012;45:989-992.
26. Sümbüllüoğlu V, Sümbüllüoğlu K. Sağlık Bilimlerinde Araştırma Yöntemleri. 6. Baskı. Hatiboğlu Basım ve Yayım San. Tic. Ltd. Şti, Ankara; 2013.
27. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.
28. Coşkun F. Tekirdağ piyasasında satılan bazı baharatın mikrobiyolojik özellikleri. [Microbiological characteristics of some spices sold in Tekirdağ markets]. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty* 2010;7:85-93.
29. Hampikyan H, Baris Bingol E, Colak H, Aydın A. The evaluation of microbiological profile of some spices used in Turkish meat industry. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 2009; 7:111-115.
30. Bhunia AK. *Escherichia coli*. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*, Springer; 2008; p.183-200.
31. T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, Tebliğ No (2009/68). Resmi Gazete: 08.01.2010-27456. Erişim: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/01/20100108-10.htm>. Erişim tarihi: 3 Ekim 2015
32. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Resmi Gazete: 29.12.2011-28157. Erişim: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>. Erişim tarihi: 3 Ekim 2015.
33. CDC, Bioterrorism Agents/Diseases. Erişim: <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp>. Erişim tarihi: 3 Ekim 2015.
34. Elmali M, Yaman H. Bitlis bölgesinde marketlerde satılan bazı baharatın mikrobiyolojik kalitesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2005;2:9-14.
35. Donia MAA. Microbiological quality and aflatoxinogenesis of Egyptian spices and medicinal plants. *Global Veterinaria* 2008;2:175-181.
36. Üner, Y. ve Ergün, Ö. Piyasada satışa sunulan çeşitli baharatın patojenler ve genel mikrobiyolojik kriterler yönünden incelenmesi. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 1999;25:245-251.
37. Manuel Viuda-Martos YRN, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *Int J Food Sci Technol* 2007;43:526-531.
38. Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 2010;21:1199-1218.
39. Erkmen O, Özcan M. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *Eur Food Res Technol* 2001;212: 658-660.
40. Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* 2005;22:273-292.