

## 1. GİRİŞ

Gıdalardaki mikrobiyal patojenler ve biyotoksinler nedenleriyle ortaya çıkabilecek hastalıklar insan sağlığı için ciddi tehlikeler oluşturmaktadır. Son yıllarda meydana gelen gıda kaynaklı hastalık salgınları, gıda kaynaklı vakaların geçmişte hiç olmadığı kadar artan bir ilgiyle izlenmesine neden olmuştur. Salgınlar, eskiye göre çok daha geniş alanlarda etkili olmakta ve daha uzun süreli sorunlar oluşturmaktadır. Diğer yandan gıda kaynaklı hastalıklar sadece kişilerin sağlığını etkilemekle kalmayıp, ailelerin gelirine olan etkisi, iş yükü kaybı, ülkelerin sağlık sistemlerine oluşturduğu yük ve ekonomik verimliliğe etkileri nedeniyle daha geniş kapsamlı sonuçlar da doğurmaktadır. Günümüzde yaklaşık 250 farklı gıda kaynaklı hastalık tanımlanmıştır ve bakteri kaynaklı zehirlenmeler bu sayının yaklaşık olarak üçte birini oluşturmaktadır (Adıgüzel, 2008).

Gıdaların üretim ve tüketimleri arasındaki basamaklarda hijyenik koşullar sağlanmadığında, gıda kaynaklı hastalık ve zehirlenmeler yönünde bir riskle karşılaşılması kaçınılmazdır. Bu nedenle prensipte gıda maddelerinin güvenliği, iyi üretim uygulamaları, kritik kontrol noktaları gibi daha çok mikrobiyolojik bulaşmayı önleyici bir yaklaşımla sağlanmaktadır. Aynı zamanda, kontrollü üretim ve sterilizasyon yöntemleri ile patojen mikroorganizmaların gıdalardan tamamen arındırılması zorunludur. Bu amaçla gıdaların indikatör patojen mikroorganizmalar, koliform grubu bakteriler ve toplam mezofilik aerobik bakteri sayıları gibi temel mikrobiyolojik analizler ile hijyenik durumlarının belirlenmesi gerekmektedir. Değerlendirme sonucunda bir risk söz konusu ise acil önlemlerin alınması sağlanmalıdır.

Gıda hijyenindeki düzenlemeler, ülkelerin kültür düzeylerinin yükselmesi, sağlık koşullarını etkileyen ilerlemeler ve bu yönlerde yapılan araştırmalara rağmen, gıda zehirlenmeleri dünya üzerinde olduğu gibi ülkemizde de halen görülmektedir (Aran, 2010). Gıda zehirlenmeleri, toplu beslenmenin yapıldığı yerlerde ortaya çıkmaktadır ve %90-99'u mikrobiyal kökenlidir. Bu tip zehirlenmeler gıda enfeksiyon ve intoksikasyonları şeklinde görülmektedir (Kitai ve Shimizu, 2005).

Gıda enfeksiyonları patojen mikroorganizmaları içeren besin maddelerinin insanlar tarafından tüketilmesiyle oluşmaktadır. *Salmonella*, *Clostridium perfringens* ve enteropatojen *Escherichia coli*'nin gıdalar vasıtasıyla insanlar

tarafından alınması sonucu oluşan hastalıklar birer enfektif gıda zehirlenmesidir (Şengöz, 2004).

Gıda intoksikasyonlarında ise, gıda maddesi içerisinde bulunan mikroorganizmaların oluşturduğu toksin insanlar tarafından alınmaktadır. *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* ve mikotoksin oluşturan mantarlar gıda intoksikasyonlarına sebep olmaktadır (Şengöz, 2004).

Gıda kaynaklı hastalık olaylarında, gıdalardaki toplam bakteri sayılarının  $10^6$  kob/g'dan fazla olduğu görülmektedir. Ancak bazı bakterilerin virulansı kuvvetlidir ve birkaç tanesi dahi enfeksiyona neden olabilmektedir. Örneğin *Salmonella* türleri gıda kaynaklı hastalıklar yönünden genellikle diğer bakterilerden daha düşük enfeksiyon dozlarında ( $<10^5$  kob/g) risk oluşturabilmektedir. Direnci düşük kişilerde ise 1-10 kob/g oranlarında dahi risk teşkil edebilmektedir (Doyle ve Cliver, 1990; Cox, 1999).

Patojen mikroorganizmaların hastalık oluşturmalarında bakterilerin virulansından başka; kişinin direnci, yaşı, bağışıklık mekanizması gibi değişik faktörlerin etkisi de söz konusudur. Ancak her toplumda toplumun gıda tüketim alışkanlıkları ve gıdaların mikrobiyolojik özelliklerine bağlı olarak gelişen bağışıklık mekanizmasında farklılık vardır. Gelişmiş ülkelerde genellikle günlük gıdalar kanalıyla alınan mikroorganizma sayıları ve tiplerinin en aza indirilmesine gösterilen özen sonucunda bağışıklığın düştüğü ve bu durumun ülke dışına çıkıldığında, gıda kaynaklı hastalıklar yönünden daha fazla risk oluşturduğu belirtilmektedir. Fakat her patojen mikroorganizma için gıdalar kanalıyla bir bağışıklık kazanılmasının söz konusu olmayacağı göz önüne alınarak tüketici sağlığı açısından hijyenik kurallara uyulması gerekmektedir (Ekici vd., 2008).

Gıda güvenliği konusunda yeni yaklaşımlar, mikroorganizmaların kültürel analiz yöntemlerinde bir seri değişikliği de beraberinde getirmiştir. Buna bağlı olarak, laboratuvarlarda otomasyon, kalibrasyon, akreditasyon, yöntemlerin geçerli kılınması (validasyon), standart yöntemlerin doğru uygulanması (verifikasyon), ölçüm belirsizliği gibi matematiksel uygulamalar ağırlık kazanmaya başlamış ve genetik-serolojik esaslı analizler laboratuvarlarda giderek yaygınlaşmıştır. Türkiye'de bu tip uygulamalar çok yeni değildir. Özellikle akademik çalışmalarda ve gıda sanayisinin kaliteye önem verilen kuruluşlarında oldukça uzun bir zamandan beri uygulanmaktadır.

Yeni geliştirilen ve kimi yerde modern kimi yerde ise yeni olarak tanımlanan bu yaklaşımların geçerliliği standart yöntemlerle kıyaslanarak sınanmaktadır. Bir başka deyişle, yeni bir analiz yaklaşımının, uluslararası platformda geçerli olarak tanınması için en azından standart yöntemlere eşdeğer performans göstermesi zorunludur.

Bu durumda klasik yöntemler hâlâ geçerlidir ve FDA ile ISO gibi kuruluşlar bu yöntemleri esas almaktadırlar. Ancak modern yöntemlerin de geçerliliği kabul edilmelidir. Kısa bir süre sonra özellikle moleküler-serolojik esaslı testlerin standart analiz yöntemi olarak geçebileceği düşünülmektedir.

Mikroorganizmaların yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesi, tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılan teknikler, kültürel yöntemler ve moleküler yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

### **1.1. Kültürel Yöntemler**

Kültürel sayımda temel yöntem, petri kutusunda yayma yöntemi ile yapılan kültürel sayımdır. Gıdada aranacak mikroorganizma sayısı 1000kob/ml ya da 10000kob/g düzeyinde ve daha fazla ise yayma kültürel sayım yöntemi uygundur. Sayı, 100kob/ml ya da 1000kob/g düzeyinde ise dökme kültürel sayım, bu değerlerden az ise EMS (En Muhtemel Sayı) yöntemi ya da analiz edilecek gıda uygun ise membran filtrasyon yöntemi kullanılır. Kültürel analizlerde selektif olmayan bir genel besiyerinde ön zenginleştirme, selektif besiyerinde zenginleştirme, selektif katı besiyerine geçiş, tipik kolonilerin izolasyonu ve tanımlanması yapılır. (Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2006)

*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 serotipi gibi gıda kaynaklı birincil patojenlerin gıdalarda bulunmasına izin verilmez. Bu nedenle bu tür patojenler için genellikle var/yok testleri uygulanır. Çoğu uluslararası standartta analiz edilecek gıda miktarı 25g ya da 25ml olarak verilmektedir ve yasal olarak analiz edilecek gıda miktarını ifade eder. (Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2006)

Bakteri popülasyonlarının sayısı ve çeşitliliği kültürel yöntemler ile tahmin edilebilmektedir. Fakat bazı bakterilerin kültür ortamında geliştirilmesi olanaksızdır ve bu tür organizmalar gelişmeye bağlı metotlarla karakterize edilemezler. Ayrıca, birçok tür için en uygun büyüme ortamları henüz

bilinmemektedir. Aynı zamanda kültürel yöntemlerde, aranan bakteriye özgü besiyerleri, katkı maddeleri, indikatör boyalar ve besiyerine seçici özellik kazandıran bileşenlerin kullanımının gerekmesi nedeniyle zahmetli hazırlık aşamalarına ve uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaç duyulmaktadır (Kell vd., 1998). Karışık mikroorganizma gruplarının geleneksel kültürel yöntemler ile belirlenmesinin güvenilirliği de oldukça sınırlıdır (Wagner ve Amann, 1997). Benzer şekilde kültürel yöntemlerin, hücrelerin bir araya toplanması veya komşu hücrelerin inhibisyon etkileri gibi teknik zorlukları da bulunmaktadır (Kell vd., 1998).

Bu nedenlerle gıda ve sularda büyük önem taşıyan bazı mikroorganizmaların güvenilir sayımı için kullanılan kültürel teknikler zaman zaman yetersiz kalmaktadır.

Mikroorganizmaların sayımında EMS yöntemi de sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. EMS yöntemi, mikroorganizmaların konsantrasyonu hakkında net bir bilgi vermezken bu konsantrasyonu istatistiksel bir yaklaşımla belirlemektedir (Tchobanoglaus ve Burton, 1991). Canlı hücrelerin en muhtemel sayıları eşit hacimdeki çok tekrarlı testler sonucunda elde edilen negatif ve pozitif sonuç sayılarının analizi ile elde edilmektedir. EMS yöntemi ile *Legionella* gibi kültür ortamında zor gelişen bakterilerin sayımının yapılması, seçici besiyerlerinin kullanımının gerekliliği ve uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaçtan dolayı oldukça zordur (Bartie vd., 2000).

FA (Floresans antikor) tekniği EMS yönteminin bu zorluklarını yenmek amacıyla geliştirilmiş bir tekniktir (Abeliovich, 1992). Bu teknik hedef organizma için antikor üretilmesini gerektirmektedir. Bu tekniğin de sınırlandığı bazı noktalar bulunmaktadır. İlk olarak, kültürü yapılamayan bakterilerin, antikor üretimi için saf kültüre olan ihtiyaç nedeniyle incelenememektedirler. Antikorların spesifik olmayan bağlanmaları arka plan floresansına neden olmaktadır (Wagner ve Amann, 1997).

Gıda ve su örneklerinin analizleri, günümüz gıda endüstrisinde gerekli bir basamak olmakla beraber, çok sayıda standarda uyulması gerekmektedir. Örneğin *Salmonella* izolasyonu ve belirlenmesi için uygulanan kültürel metotlarda hassas bir laboratuvar çalışmasına ve zamana ihtiyaç duyulmaktadır. *Salmonella* aranması için kullanılan standart kültürel yöntem (AOAC-Assoc. Official Analytical

Chemists/BAM-Bacteriological Analytical Manual, 1990; FDA-Food and Drug Administration, 1984) ile negatif örneklerin belirlenmesi en az 4 gün sürmektedir ve eğer şüpheli koloniler tespit edilirse doğrulama amacıyla yapılan çalışmalarla bu süre 2-3 gün daha uzamaktadır. Bu nedenle, *Salmonella* aranması amacıyla hızlı tekniklerin geliştirilmesi gıda endüstrisinde gelişmekte olan ve de ihtiyaç duyulan bir işlemdir.

Direkt mikroskopik sayımlar ile canlı hücre sayımlarına göre daha fazla sayı elde edildiği sıklıkla rapor edilmiştir (Amann vd., 1995). Çoğu bakteriyel hücre canlı halde, mikroskopik olarak görüntülenebilmekte fakat besi yerlerinde koloni oluşturmamaktadır. Bu sessiz ama aktif olan hücreler iki nedenden dolayı belirlenememektedir: i) Bilinen türler olup uygun kültür koşulları uygulanmamıştır veya kültüre edilemeyen türlerdir. ii) Bilinmeyen türlerdir ve henüz uygun kültürel yöntemler ile üretilenmemişlerdir. Bu durum *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, ve *V. vulnificus* gibi patojenler ile yapılan çalışmalarda ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Bu bakteri türleri, tuzlu sular veya düşük sıcaklıklar gibi uygunsuz ortam koşullarında hızlı bir şekilde kültüre edilemeyen bir duruma geçebilirler (Amann vd., 1995).

## 1.2. Moleküler Yöntemler

Farklı suşların belirlenmesi, kültürel metotların hata paylarının azaltılması ve kısa sürede sonuç alınması amaçlanıyorsa moleküler araçların kullanılması mutlaka gereklidir.

Ortalama 1500 nükleotidden oluşan bir bakteri 16S rRNA (ribozomal RNA), güvenilir bir filogenetik analiz için yeterli bilgiyi taşımaktadır (Amann vd., 1995) ve rRNA tüm organizmalarda bulunmaktadır. Evrimin ilk başlarından beri fonksiyonu değişmemiştir ve bu nedenle nükleotid sekansları ve sekonder yapıları yüksek derecede korunmuştur. rRNA aynı zamanda organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri etkileyen değişken bölgeler de içermektedir. Değişken bölgeler, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) için primerlerin veya hibridizasyon problemlerinin hedefleri için uygun bölgeler olarak kullanılabilir. Problemler ve primerlerin, ribozomun küçük alt biriminin 16S/18S rRNA'larına veya büyük alt biriminin 23S/28S rRNA'larına hedeflenmesi için diğer nedenler ise; lateral gen aktarımının azlığı; 16S için yaklaşık 1500 nükleotid ve 18S için yaklaşık 3000 nükleotid olmak üzere oldukça uzun nükleotid dizilerine sahip olmaları;

karşılaştırmalı sekans analizi yapılabilmesi için geniş rRNA veri tabanlarının bulunmasıdır (Maidak vd., 1999; Van de Peer vd., 1999).

1993’ de Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) ‘Structure/function analysis of natural microbial communities’ başlıklı özel bir araştırma programı başlattığından beri rRNA hedefli nükleik asit problemler moleküler biyologlar için sıklıkla kullanılan özelleşmiş bir araç haline gelmiştir. Bu yaklaşım son 20 yılda hibridizasyon tekniklerinin kullanılmasına ve oldukça ilginç bulgulara ulaşılmaya neden olmuş ve yeni araştırma programlarının başlatılmasına itici güç olmuştur (Amann ve Ludwig, 2000).

Son yirmi yıldır, immunoassay veya DNAH (DNA hibridizasyonu) gibi hızlı yöntemler geliştirilmiştir (Flowers vd., 1987; Izat vd., 1989; Curiale vd., 1990; Cano vd., 1992; Aabo vd., 1993). DNAH yöntemleri, 1989 yılında AOAC ve FDA tarafından kabul görmüştür (Flowers vd., 1987; Curiale vd., 1990).

SSU (Küçük Alt Birim) rDNA (ribozomal DNA) amplifikasyonu, klonlanması ve sekanslanması; DGGE (denature jel gradient elektroforezi) ve TRFLP (terminal restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi) gibi birçok moleküler teknik mikrobiyal çeşitliliğin araştırılmasında kullanılmıştır (Rusch vd., 2003; Xu vd., 2005; Schwartz vd., 2007). DGGE, RFLP (restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi), PCR gibi 16S rRNA temelli yöntemlerin mikrobiyal çeşitliliği belirlemede güçlü yöntemler olmasına rağmen, farklı hücrelerdeki farklı miktarlardaki rRNA içeriği nedeniyle, toplam hücre sayılarının belirlenmesinde yeterli netliği sağlayamamaktadır (Amann ve Ludwig, 2000).

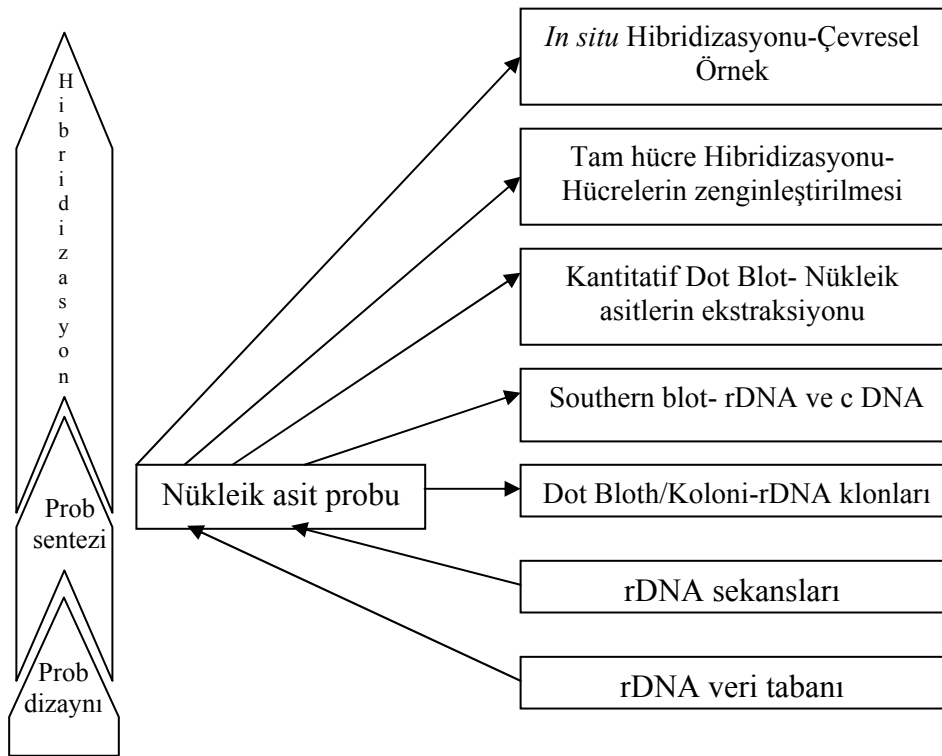
Bakterilerin 16S rRNA’ sına hedefli floresans işaretli oligonükleotid problemler ile gerçekleştirilen Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) tekniği, doğal çevrelerdeki bakterilerin belirlenmesi için uzun yıllardır kullanılmaktadır (Bottari vd., 2006).

### **1.2.1. Hibridizasyona Dayalı Teknikler**

Nükleik asit problemleri enzimatik veya kimyasal olarak sentezlenebilirler. Floresans boya ile veya radyoaktif olarak işaretlenen rRNA hedefli oligonükleotid problemler tek zincirli sekansın komplementeri olarak çift zincirli nükleik asiti elde etmek amacıyla kullanılırlar. Bu işleme hibridizasyon işlemi adı verilmektedir. Hibridizasyon teknikleri ile çevresel örneklerin karakterizasyonu amacıyla rRNA

hedefli nükleik asit problemlerin kullanımını gösteren akış şeması Şekil 2.1.' de verilmiştir.

Oligonükleotid ve hedef RNA arasında hibrid oluşumundan sonra, farklı belirleme teknikleri kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları, radyoaktif ve floresans işaretli problemlerdir. Hücre hibridizasyonu için kullanılan oligonükleotid problemler genellikle, FITC (Fluorescein isothiocyanate), CY3 (Cyanine 3) veya CY5 (Cyanine 5) gibi floresans belirteçler ile işaretlenirler. Hibritleşme olan bölgelerde, bu boyaaların verdiği sinyaller, epifloresan mikroskobu ve konfokal lazer tarayıcı elektron mikroskobu yardımıyla incelenebilirler.



Şekil 2.1. Hibridizasyon teknikleri ile çevresel örneklerin karakterizasyonu amacıyla rRNA hedefli nükleik asit problemlerin kullanımını gösteren akış şeması

Hibridizasyona dayalı tekniklerin önemli avantajları bulunmaktadır;

- a. 16S rRNA sekansları organizmalar arasında filogenetik bilgi sağlarlar ve aktivitelerine bağlı kalmadan farklı popülasyonları birbirinden ayırabilirler. (Coşkuner, 2002)
- b. Aynı örnekte farklı floresans boyalarla işaretli çoklu problemlerin kullanımına olanak sağlarlar (Eyice, 2004).
- c. DNA veya RNA amplifikasyonu olmadan hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesine olanak sağlarlar (Coşkuner, 2002).
- d. Yüksek özgüllükte ve hızlı sonuç verirler (Coşkuner, 2002).
- e. Kültür ortamında geliştirilemeyen organizmaların ortamlarında görüntülenmesine olanak sağlarlar (Coşkuner, 2002).

#### **1.2.1.1. Floresans *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği**

Mikroorganizmaların *in situ* (yerinde) tanımlanmaları ve sayımları, morfolojik yapısı bozulmamış hücrelerin içindeki rRNA' ların özel bir yöntemle floresans olarak gözlenmesi esasına dayanarak yapılmaktadır. Daha sık kullanılan bir terim olan 'yerinde hibritleşme' hücrelerin kendi habitatlarında belirlenmesi anlamına gelmektedir (Amann vd., 1995).

#### **FISH tekniğinin temel basamakları**

Tipik bir FISH protokolünde 4 ana basamak bulunmaktadır. Bunlar;

- a. Fiksasyon ve geçirgenleştirme: Örnek içindeki hücreler, fiksasyon işlemi ile morfolojik bütünlükleri korunarak geçirgenleştirilirler. Bu amaçla alkol ve aldehitler kullanılır.
- b. Hibridizasyon: Örnekler floresans işaretli oligonükleotid prob içeren hibridizasyon tamponu içinde inkübe edilirler.
- c. Yıkama: Örnekler yıkama tamponu ile yıkanarak bağlanmamış problemler uzaklaştırılır.



d.İnceleme: Örnekler lam üzerine alınarak epifloresans mikroskop veya CSLM (Confocal Scanning Laser Mikroskop) altında incelenir.

### **FISH tekniğinde dikkat edilmesi gereken noktalar**

FISH yönteminin en önemli noktalarından biri her bir prob için optimum hibridizasyon koşullarının belirlenmesidir. Optimal hibridizasyon sıcaklığı problemlerin yanlış rRNA sekanslarına bağlanmalarını engellemek amacıyla mutlaka belirlenmelidir (Head vd., 1998).

Yıkama tamponlarındaki NaCl (sodyum klorür) konsantrasyonu da hibridizasyonun dayanıklılığı için önemli faktörlerden biridir. NaCl konsantrasyonunun artması hibridizasyonun özgüllüğünü azaltırken, farklı NaCl konsantrasyonları özgül olmayan bağlanmaları elimine etmektedir.

Tm (erime sıcaklığı) değeri de hibridizasyonu etkilemektedir. Tm değeri DNA'nın %50' sinin eridiği sıcaklıktır ve oligonükleotid problemlerin ayrışma sıcaklığı (Td) ile ilişkilidir. Yüksek GC içeriği, guanin ve sitozin baz çiftleri arasındaki bağların (üçlü hidrojen bağı) adenin-timin baz çiftleri arasındaki bağlardan daha güçlü olması nedeniyle daha yüksek erime sıcaklıklarına neden olur (Madigan vd., 1997).

#### **1.2.1.2. FISH yönteminde karşılaşılan sorunlar**

##### **Hücre ve sinyalin yokluğu**

Tam hücre hibridizasyonu tek bir hücreyi tanımlamakta kullanılabilir fakat bu hücreyi mikroskobik alana taşıyabilmek zaman zaman zor olmaktadır (Amann vd., 1995).

##### **Düşük sinyal yoğunluğu**

Düşük sinyal yoğunluğu da diğer bir önemli sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Eğer problemlerle ilgili bir sorun yoksa bu problem sadece hücre sayısının azlığından veya hedef rRNA ların hücre içine yetersiz girişinden kaynaklanabilir (Amann vd., 1995).

**Gelişme hızı ve hücrel rRNA içeriğinin ilişkisi**

rRNA içeriği ve bakterilerin gelişme oranları arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Buna göre, yavaş gelişen hücreleri belirlemek düşük hücrel rRNA içerikleri nedeniyle zor olmaktadır. Bu sayede probun oluşturduğu floresans miktarı, hücrelerin gelişme yeteneği hakkında fikir vermektedir (Amann vd., 1995).

**Hücre geçirgenliği**

Hücre hibridizasyonunda aşılması gereken en önemli sorun, probun hücre içine girişidir. Bu, alkol gibi denaturantlar veya formaldehit veya paraformaldehit gibi çapraz bağlayıcı ajanlar tarafından sağlanmaktadır. Bu fiksasyon yöntemleri sadece hücre geçirgenliğini değil aynı zamanda hücrelerin hibridizasyon sırasındaki morfolojik bütünlüklerini korumaya da yaramaktadır (Head vd., 1998).

**Hedefin ulaşılabilirliği**

Yüksek rRNA içeriğine sahip, hızlı gelişen bir kültür düşük sinyal yoğunluğu gösterdiği zaman, rRNA hedefli problemlerin fikse edilmiş hücreler içine olan sınırlı difüzyonu veya ribozomlardaki RNA-RNA ve RNA-protein gibi üst düzey yapıların prob hibridizasyonunu engellemesi gibi sorunlar olabileceği akla gelmektedir (Amann vd., 1995). Bu nedenlerden hangisinin bu soruna neden olduğunun bulunması, evrensel bir probun kullanılması ile ayırt edilebilir. Evrensel bir prob kullanıldığında yüksek sinyal elde edilmesine karşın diğer bir probun kullanılması düşük sinyale neden oluyorsa sorunun hedef bölgenin ulaşılabilirliğinin yetersizliğinden kaynaklandığı anlaşılır (Head vd., 1998).

**Hassasiyet**

Hibridizasyonun hassasiyeti karşılaşılabilecek sorunlardan biridir. Genellikle, sadece aktif ve yüksek miktarda ribozom ve hedef rRNA içeren hücreler, tek bir floresans boya ile işaretli problemler ile güçlü sinyal vermektedirler. Hibridizasyonun hassasiyetini artırmak için, çoklu floresans işaretli ve enzim-bağlı problemler veya sinyal artırılmasına yönelik sistemler geliştirilmiştir. Bunlara ek olarak, yüksek hassasiyetli görüntüleme sistemleri de hibridizasyon çalışmalarının hassasiyetini artırmak amacıyla geliştirilen tekniklerdendir (Head vd., 1998).

### Arka plan floresansı

Yüksek miktarda arka plan floresansı da sık karşılaşılan diğer bir problemdir. *Archeae* gibi bazı mikroorganizmalar işaretli olanlardan daha fazla sinyal gösterebilirler. Bu sorun, çoklu floresans oligonükleotid problemlerin kombine olarak kullanılmaları veya emisyon dalga boyları oto floresansla aynı dalga boyuna denk gelmeyen floresans boylarının kullanımı ile çözülebilir (DeLong vd., 1989). Bu problemin etkilerinden korunmak için mutlaka pozitif ve negatif kontroller kullanılmalıdır.

### 1.3. İndikatör Bakteriler

İndikatör mikroorganizmalar gıda sanayiinde kurallara uygun olarak üretim yapılıp yapılmadığının göstergesi olarak değerlendirilir. Hammadde, üretim teknolojisi, iyi ve doğru üretim uygulaması konularında indikatör mikroorganizmalar bilgi verir. İndikatör mikroorganizmalar gıdaların kalitesinin göstergesidir (Anonim, 2010).

İndikatör mikroorganizmalar ile patojenler birbirinden tamamen farklı değerlendirilmelidir. Gıda kalitesi hakkında fikir elde etmek için kullanılan indikatör mikroorganizmalar toplam bakteri, toplam maya ve küf, toplam koliformlar, fekal koliformlar gibi mikroorganizma gruplarıdır. Toplam bakteri içinde sıklıkla patojen bakteriler bulunmakla birlikte, analiz yöntemi uyarınca bu bakteriler sadece toplam bakteri olarak değerlendirilir. Aksine olarak bir gıda maddesinin üretiminde kullanıldığı için yararlı olarak değerlendirilen bir mikroorganizma (örneğin, rokför peyniri yapımında kullanılan *Penicillium roqueforti*) başka bir gıdaya bulaşırsa yine indikatör mikroorganizma olarak toplam maya ve küf analizinde standartların üzerinde küfe rastlanacağı için o ürün bozulmuş olarak kabul edilir (Anonim, 2010).

Gıda işletmeleri kendi kalite programları çerçevesinde hammaddeden başlayarak farklı mikroorganizmaları indikatör olarak belirleyebilir. Ayrıca, kamu kontrol kuruluşları tarafından belirlenen indikatör mikroorganizmalar da bulunur. Gıda endüstrisinde indikatör olarak seçilen mikroorganizmaların belirli özellikler taşıması gerekmektedir. Öncelikle gıdalarda mikrobiyal kalite ile ilişkili bu mikroorganizmaların varlığı kolaylıkla ve hızla belirlenebilmeli ve sayılabilmeli, diğer mikroorganizmalardan ayrılabilmesi, gıdada bulunan doğal flora tarafından

bu mikroorganizmaların gelişmesi engellenmemelidir. İlişkili olarak, toplam bakteri, toplam maya ve küf, toplam ozmofilik ve ozmotolerant mayalar, kserofil küfler, toplam proteolitik bakteriler, toplam koliformlar gibi farklı mikroorganizmalar farklı gıdaların kalitesinin belirlenmesinde indikatör mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. İndikatör mikroorganizmalar olarak en önemli grup fekal kontaminasyon indeksi bakterilerdir. Fekal kontaminasyon indeksini oluşturan bakteriler, gıdaya hammaddeden başlayıp gıdanın taşınmasına kadar bir ya da daha fazla aşamada doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaştığının göstergesidir. Fekal koliformlar, enterokoklar ve *Clostridium perfringens* tipik fekal kontaminasyon indeksidirler. Fekal koliformlar yerine yaygın olarak *E.coli* kullanılır. Bunlardan enterokoklar sularda fekal kontaminasyon belirlenmesi için diğerlerine göre daha iyi bir gösterge olarak kabul edilir. Analiz edilen materyalde bağırsak kökenli olan bu bakterilerin varlıklarının gösterilmesi o materyalde bağırsak kökenli her bakterinin bulunduğu anlamına gelmemekte, sadece bir potansiyel tehlikenin olduğuna işaret edilmektedir. İnsanın da dahil olduğu, herhangi bir sıcak kanlı hayvanın bağırsağında başta *E.coli* olmak üzere diğer fekal koliformlar da mutlaka vardır, ancak o bireyde *Salmonella* ve *Shigella* gibi yine bağırsak kökenli patojenler bulunmaz (Anonim, 2010).

Fekal kontaminasyon indeksini oluşturan bakterilerin analiz edilen materyalde bulunması bir hijyen eksikliğidir. Fekal kontaminasyon indeksini oluşturan bakterilerin aranmasında standart mikrobiyolojik analiz yöntemleri kullanılmakla birlikte, gıda maddesinin türüne göre farklı besiyerleri kullanılmaktadır. Koliformlar ve enterokokların aranmasında, patojen bakterilerin aranmasında kullanılan besiyerlerine yapılan ekimlerin, fekal koliform ve enterokokların üreme ve gelişme sıcaklığı olan 44,5°C'de inkübasyonu en sık kullanılan yöntemdir. Yine fekal koliformlar ve enterokoklar için geliştirilmiş ticari besiyerleri de bulunmaktadır (Anonim, 2010).

Gıda maddeleri kadar, sularda da fekal kontaminasyon önemlidir. Sularda aranan fekal kontaminasyon indeksi bakteriler ağırlıklı olarak enterokoklar ve fekal streptokoklardır. Diğer taraftan su sistemlerinde yerleşen önemli patojen bakterilerin en bilineni ve bugüne kadar yaşanan salgınların nedeni *Legionella pneumophila* dır (Bartie vd., 2000).

### 1.3.1. *Escherichia coli*

İlk defa 1885'te Dr. Theodor Escherich (Holt vd., 1994) tarafından tanımlanan *Escherichia coli*, 1950 yılına kadar insan ve hayvanların bağırsak sisteminde normal florada bulunan, patojen olmayan bir mikroorganizma olarak kabul edilmiştir. Gıda hijyeninde indikatör mikroorganizma olarak kabul edilen ve fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilen *E. coli*; bazı serotiplerinin hastalıklara neden olduğunun ortaya çıkmasıyla potansiyel bir patojen olarak tanımlanmıştır (Doyle ve Cliver, 1990).

*E. coli*, *Enterobacteriaceae* familyasına ait, gram negatif, çubuk şeklinde, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, peritratik flagellası ile hareketli bir bakteri olup insan ve çoğu sıcakkanlı hayvanların doğal bağırsak florasında bulunmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998). Ortalama 1,1-1,5x2,0-6,0µm boyutlarındadır. Laktozu fermente ederler. Optimum üreme sıcaklığı 37°C olup 7-46°C' ler arasında üreme görülür. pH 4,4 ile pH 9,0 değerlerinde canlılığını koruyabilmektedir. Minimum aw (su aktivitesi) değeri 0,95 değerindedir. Genetik olarak *Shigella* ile benzerlik gösterir. *E. coli* diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden pek çok şekeri fermente etme özelliği ve diğer biyokimyasal testlerle ayrılmaktadır (Adams ve Moss, 1995). *E. coli* ve özellikle *E. coli* O157:H7 düşük pH (pH 3,6'nın altında) değerlerindeki ortamlarda gelişim gösterebilmektedir. Ayrıca aside maruz kalma durumunda asit toleransının arttığı kaydedilmiştir (Lake vd., 2002). Aside dayanıklı olduğundan dolayı pH' sı 1-2 olan midede yaklaşık 3sa süren sindirime dayanmakta ve ince bağırsaklara geçebilmektedir. Donma ve asiditeye karşı da son derece dayanıklı olan *E. coli* O157:H7'den korunmak için ABD'de kırmızı etlerin ışınlanmasına izin verilmiştir (Park vd., 1999). Patojenitesi, mikroorganizmanın insanların bağırsak epitellerine bağlanıp, verotoksin olarak da bilinen Shiga toksini üretmesine bağlıdır (Duffy vd., 2006). Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) çok düşük miktarda bile olsa, hastalık oluşturmaya yeterli olduğu bilinmektedir (Karch vd., 1999).

*E. coli* genel olarak özellikle çocuklarda diyare, hemorojik kolit, dizanteri, böbrek ve mesane enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları, septisemi, hemolitik üremik sendrom, zatürree, menenjit ve bu hastalıklardan bazılarının sonucu ölüm vakalarına neden olabilmektedir (Coia, 1998; Bell ve Kyriakides, 2002). Bu bakterinin insanlar için patojen olanları 6 grupta toplanmaktadır. Bunlar; Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), Enterotoksijenik

*E.coli* (ETEC), Enterohemorajik *E.coli* (EHEC), Enteroagregatif *E.coli* (EaggEC), Diffuz adeziv *E.coli* (DAEC) olarak sıralanabilir (Erol, 1999). *E.coli* O157:H7, en çok izole edilen ve en yüksek virulans özellik gösteren Stx (shiga toksin üreten) üreten *E.coli*' dir. Diğer önemli EHEC serotipleri, O26: H11, O103: H2, O111: NM ve O113:H21'dir. *E.coli* her ne kadar gıda kaynaklı salgınlara neden olduğu uzun yıllardır kabul edilse de gıda endüstrisi açısından son zamanlarda özellikle verotoksin üreten *E.coli* (Vero sitotoksijenik *E.coli*: VTEC) esas tehlike olarak görülmektedir. İngiltere ve ABD'nin de içinde bulunduğu pek çok ülkede başta *E.coli* O157:H7 olmak üzere, *E.coli* O26, O103, O111, 118 ve O145 VTEC' in pek çok enfeksiyona veya hastalığa neden olduğu rapor edilmiştir (Bell ve Kyriakides, 2002). İnsanlarda görülen *E.coli* O157:H7 enfeksiyonları daha çok pişmemiş et ve sütlerden kaynaklandığı bilinmekle (Armstrong vd., 1996) beraber dışkıyla kontamine olmuş et ve diğer gıdalarda bu suşun esas kaynağı olarak belirtilmektedir (Jo vd., 2004) . *E.coli* varlığını belirlemek için daha çok ELISA, PCR-ELISA (Enzim bağlı immünosorbent assay), PCR-elektroforez, Real time PCR gibi metotlar kullanılmaktadır (Lazcka vd., 2007).

### 1.3.2. *Salmonella* spp.

*Salmonella*, *Enterobacteriaceae* ailesindeki *Salmonellae* kabilesinin tek cinsidir (Cox, 1999). 1885 yılında Amerikalı bakteriyolog D.E. Salmon ilk anda bu mikroorganizmayı *Bacterium suipestifer* olarak adlandırmış ve domuz vebasına neden olan domuz kolera *Bacillus* şeklinde karakterize etmiştir (Bell ve Kyriakides, 2002).

*Salmonella*' lar, fakültatif anaerob, gram negatif, çubuk şeklinde, *S.gallinarum* hareketsiz, *S.pullorum* çoğunlukla hareketsiz, diğer türleri ise hareketli olan bir bakteri olarak bilinmektedir. Ancak hareketli türlerin bazı mutantları da hareketsizdir. *Salmonella*' lar, 0,7-1,5x2-5µm boyutlarında kemoorganotrof beslenme şekli gösteren, başta glikoz olmak üzere arabinoz, maltoz, ramnoz, sorbitol ve ksiloz gibi karbonhidratları ve polihidroksi alkolü fermente ederek asit ya da asitle birlikte gaz oluşturur. Ancak *S.typhi* gaz üretmez. Spor ve kapsül oluşturmamakla birlikte, mikrokapsülleri mevcuttur (Tunail ve Halkman, 2000; Bell ve Kyriakides, 2002; Çarlı, 2003)

Son araştırmalara göre 2300-2500 olduğu bildirilen *Salmonella* serotiplerinin hepsi iki tür içine girmektedir. Bu serotiplerin tümü patojenite göstermekle

beraber, Őu an için 150 tanesinin insan hastalıklarıyla ilgili olduğu belirtilmektedir. Serotiplerin ağırlıklı bölümü günümüzde *S.enterica* türü içinde toplanmıştır. İnsandan ve sıcakkanlı hayvanlardan en çok izole edileni *S.enterica subspecies enterica* dır. Diğer *S.enterica* alt türleri ve *S.bongori* genellikle daha çok çevreden ve sıcakkanlı hayvanlardan gelmektedir ve daha düşük patojeniteye sahiptirler (Doyle ve Cliver, 1990; Popoff vd., 1998; D'Aoust, 2000).

*Salmonella* lar mezofilik bakteriler olup, minimum üreme sıcaklığı 7°C maksimum üreme sıcaklığı 50°C dir. Optimum reme sıcaklığı ise 35-37°C olarak belirtilmektedir (ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996; D'Aoust, 2000). *Salmonella* ların minimum üreme pH değeri 3,8, optimum 7-7,5, maksimum 9,5'dir. Doyle ve Cliver (1990) pH 3,7 değerinde üremenin çok nadir görülebileceğini belirtmişlerdir. Minimum reme pH değeri sıcaklık, asit varlığı, nitrit varlığı gibi birçok faktörlerden etkilenmektedir. Optimal pH değerinde inaktivasyon, sıcaklık ve asit tipi içeriği gibi pek çok faktöre bağlı olduğu bilinmektedir. Su aktivitesi değeri düŐtükçe geliŐime izin veren pH değeri yükselmektedir (Doyle ve Cliver, 1990). *Salmonella* lar için minimum üreme aw değeri 0,94, optimum 0,99'dur (Lake vd., 2002). *Salmonella* lar genellikle % 3-4 tuz varlığında inhibe olmalarına rağmen tuza karşı toleransları 10-30°C lerde sıcaklık yükseldikçe artıŐ göstermektedir. Yüksek tuz konsantrasyonu gıdadaki mikro floranın gelişimini durdurarak raf ömrünü uzatmaktadır. Tuz ilavesiyle birlikte bakterinin ölümüne neden olan bakteriyostatik etki su aktivitesi değerindeki azalmadan kaynaklanmaktadır (Ayres vd., 1990).

Genel olarak *Salmonella* ların neden olduğu hastalıklar salmonellozis olarak adlandırılmaktadır (Doyle ve Cliver, 1990). *Salmonella* enfeksiyonları, insanlarda üç farklı sendroma yol açmaktadır. Bunlardan ilki *S.typhi*'nin neden olduğu tifo, en ciddi sendromdur (Haimovich ve Venkatesan, 2006). İkinci grupta enterik hastalıklar yer almaktadır. nc grupta ise salmonellozisin en yaygın tipi olarak bilinen gastroenteritis gıda zehirlenmeleri yer almaktadır (Doyle ve Cliver, 1990).

*Salmonella* lar için minimal enfeksiyon dozu (MID), serotipe bağlı olduğu kadar, kişinin yaşı, direnci ve içinde bulunduğu gıdanın türü gibi diğer faktörlerden de etkilenmektedir. Çocuklarda, yaŐlılarda, ağır hastalık geçirmiŐ, radyoterapi, kemoterapi görmüş kişilerde enfeksiyon dozunun 10<sup>2</sup>kob/g' a kadar indiği görülmektedir (Doyle ve Cliver, 1990; Cox, 1999). Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology (Holts vd., 1994)' de hastalığa neden olan doz  $10^8$ - $10^9$ kob/g şeklinde belirtilmişse de Doyle ve Cliver (1990), daha düşük sayıda hastalık yaptıklarını ve kural olarak  $10^5$ kob/g üzerindeki *Salmonella* sayısının hastalığa neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu enfeksiyon dozu genel olarak doğru olsa da, çikolata gibi mide pH sını yükselten ve *Salmonella*'nın mide asiditesinden korunmasını sağlayan gıdalar için  $10^2$ kob/g kadar düşük dozların bile hastalık oluşturabildiği gözlenmiştir (Hayes, 1995).

Kümes hayvanlarının *Salmonella* enfeksiyonlarının yayılmasında önemli bir yeri vardır. Geçmişte kanatlılar ve yumurta bir *Salmonella* kaynağı olarak görülmüştür. Bazı araştırmacılar *Salmonella* ile kanatlıların özel bir ilişki içinde olduğunu ileri sürmüşlerdir (Göktan, 1990). Capita vd. (2002) salmonellozisin dünyada en yaygın görülen gıda zehirlenmelerinden biri olduğunu belirtmiş, kanatlı etleri ve bunlardan hazırlanan ürünlerin *Salmonella*'ların en önemli rezervuarı olduğunu bildirmişlerdir. En önemli bulaş kaynaklarının kontamine et ürünleri ile yumurta olduğu da belirtilmektedir (Erol, 1999; Mutluer, 1991). Huis in't Veld vd. (1994), salmonellozise yol açan gıdalar arasında ilk sıralarda yer alan tavuk eti ve kırmızı etin *Salmonella*'lar ile kontaminasyonu genellikle mezbahada kesim, iç organların çıkarılması ve parçalama aşamalarında meydana geldiğini belirtmişlerdir. *Salmonella*'nın bu hayvanlarda hastalığa neden olmadığı belirtilmektedir (Butaye vd., 2006). ELISA, sandwich ELISA, PCR-ELISA yöntemleri *Salmonella*'ların belirlenmesinde kullanılan teknikler arasında yer almaktadır (Lazcka vd., 2007).

### 1.3.3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus* ilk kez 1882 yılında Alexander Ogston adlı bir cerrah tarafından insanlarda piyogenik enfeksiyonlara neden olduğu belirtilerek ortaya çıkmıştır (Adams ve Moss, 1995). *Staphylococcus spp. Micrococcaceae* familyasında yer alan gram pozitif, kok şeklinde, aerob ya da fakültatif anaerob bir mikroorganizmadır. Sıvı besiyerlerinden yapılan mikrobiyolojik muayenelerde üzüm formunda görülür. Hareketsiz olup spor oluşturmaz fakat genç hücrelerde kapsül görülmektedir. Triptik soy agar gibi seçici olmayan besiyerlerinde beyaz-krem renkte ya da parlak turuncu renkte renk pigmentasyonu yapar. 0,5-1,5 µm boyutlarında olup, tek, çift, dördü, kısa zincir oluşturacak şekilde veya düzensiz kümeler şeklinde görülebilmektedir. Mannitol ve çeşitli şekerleri fermente ederek asit oluşturur ancak gaz oluşturmaz. Kanlı agarda beta-hemoliz yapma özelliğine sahiptir ( Sutherland ve Varnam, 2002).



*Staphylococcus* katalaz pozitif oksidaz negatiftir. Optimum gelişme sıcaklığı 37°C de olup, 7-48°C sıcaklık aralığında gelişim görülmektedir. Optimum pH değeri 6-7' dir. Gelişimin görüldüğü minimum pH değeri 4 maksimum 9,8-10 dur. %5-7 tuzlu ortamda gelişim gösterir. Bazı türlerin %20' lik tuz konsantrasyonuna kadar gelişebildiği belirtilmiştir. Düşük aw değerine sahip ortamlarda yaşayabilmektedir. 0,83-0,99 aw aralığında gelişim gösterirken *S. aureus*, enterotoksin üretmesi için minimum 0,86 aw değerine ihtiyaç duyar. Optimum aw değeri ise 0,99-0,99 dur. Üzüm salkımına benzeyen bir şekle sahip olmasından dolayı *Staphylococcus* olarak adlandırılmıştır (Adams ve Moss, 1995; Erol, 1999; Martin ve Iandolo, 1999).

Stafilokoklar, sporsuz bakteriler içinde çevre şartlarına ve dezenfektanlara en çok dayanan, kültürlerde 40°C' de 2-3 ay, -200°C' de 3-6 ay dayanma süresine sahip mikroorganizmalardır. Stafilocoklar aynı zamanda antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları ile önem kazanmışlardır. Penisilin tedaviye girdiği 1945 yılından itibaren *S.aureus* suşlarında beta-laktamaza bağlı penisilin direnci hızla artmıştır. 1960 yılında penisilinaze dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin kullanıma girmesiyle birlikte bir yıl içinde metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşları Avrupa'da saptanmaya başlanmıştır. İlk "epidemik MRSA" suşu 1980'de İngiltere'de tanımlanmış ve ardından farklı coğrafik bölgelerden de dirençli suşlar bildirilmeye başlanmıştır. Günümüzde MRSA tüm dünyada hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Şengöz vd., 2004). Pesavento vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada kanatlı eti, domuz eti ve sığır etinden oluşan 176 örnekten 42 adet *S.aureus* izole edilmiş ve bunların %30,95' inin en az 3 antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği belirtilmiştir.

Bütün dünyada sıklıkla rastlanan bakteriyel kaynaklı gıda zehirlenmesi olguları arasında ilk sıralarda yer alan *Staphylococcus* intoksikasyonları, sindirim sistemi üzerine etkili enterotoksinler tarafından meydana getirilirler. Bazen diğer stafilocok türleri de stafilocokal enterotoksin üretseler de toksinler hemen hemen yalnızca *S.aureus* tarafından oluşturulurlar (Erol, 1999). *S.aureus* dışında *S.intermedius*, *S.hyicus* ve *S.epidermidis* türleri de enterotoksin oluşturma özelliğine sahiptir (Bukowski vd., 2010).

*Staphylococcus* cinsi içinde en önemli iki tür *S.aureus* ve *S.epidermidis*' tir. Birçok *S.aureus* suşu koagulaz pozitifdir. *S.epidermidis* ise koagulaz negatiftir. Her

iki tür de patojen olmakla birlikte özellikle *S.aureus* insan ve hayvanlarda apseli enfeksiyonlara ve hayvanlarda mastitise neden olmaktadır. *Staphylococcus* türlerine insanların ağız, burun, el ve derilerinde normal veya geçici flora olarak her zaman rastlanmaktadır. Bu bakteriler özellikle derideki sivilce ve yaralarda yaygın olarak bulunmaktadır.

*Staphylococcus* türleri patojen ve patojen olmayan olarak iki gruba ayrılmaktadır. Patojen olanlar olmayanlardan koagulaz üretimleri, manitolü fermente etmeleri, termostabil DNaz testlerinde pozitif sonuç vermeleri ve kanlı agar besiyerlerinde kolonilerin etrafında berrak zonlu hemoliz oluşturmalarıyla ayrılmaktadır. *Staphylococcus*' un en önemli kontaminasyon kaynağı hijyen ve sanitasyon kurallarına uymayan gıda işletmeleridir. Gıdalardaki tehlike sınırı  $10^6$  kob/g olarak kabul edilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

*S.aureus* başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek düzeyde duyarlılık göstermektedir. Dolayısıyla gıdalarda ve/veya işlem ekipmanlarında bu mikroorganizma ve/veya toksinlerine rastlanması zayıf bir sanitasyon göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Isı uygulaması ile birlikte *Staphylococcus* türlerinin çoğu inaktive edilebilmektedir (Erol, 1999; Sutherland ve Varnam, 2002). Gıdaların çoğunda *Staphylococcus* türleri pH değerleri 5,5-6,6 arasında enterotoksin üretirken, pH değeri 5' in altında olan ortamlarda genelde toksin oluşturamadıkları bildirilmektedir. Diğer taraftan, özellikle *S.aureus* en çok %20 tuz konsantrasyonunda üreyebilmekte ve en çok %10 tuz konsantrasyonunda toksin oluşturmaktadır (Erol, 1999).

*Staphylococcus*' lar karışık kültürlerde diğer mikroorganizmalar tarafından kolayca baskılanır. *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* önemli baskılayıcı bakteriler olarak bildirilmektedir. Bunun yanında *E.coli*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Aerobacter*, *S.aureus*' un gelişimi üzerine baskılayıcı etki gösterirler (Erol, 1999).

Stafilokok'ların salgıladıkları toksinler ekzotoksin ve enterotoksin olarak ikiye ayrılmaktadırlar (Leloğlu, 1997). Ekzotoksinler, hemolizinler, lökositinler, lökosit sitotoksinler, eksofoliyatif toksin, pirojenik ekzotoksin ve toksik şok sendromu toksin 1'den oluşmaktadır (Arbuthnott vd., 1990).

*S.aureus* 4sa gibi kısa bir inkübasyon periyoduna sahiptir. Bulantı, kusma, mide krampı, halsizlik ve diyare görülen belirtilerdir. *S.aureus*, A, B, C1, C2, C33, D ve E olmak üzere 7 tane protein yapıda ekzotoksin üretmektedir. Daha önce F tipi olarak adlandırılan toksinin, enterotoksin olmadığına anlaşılmaya üzerine Toksik Şok Sendrom Toksin 1 olarak adlandırılmıştır. A ve D toksinleri tek başlarına veya kompozisyon halinde salgınların büyük bir çoğunluğuna neden olmaktadır (Adams ve Moss, 1995; Erol, 1999; Sutherland ve Varnam, 2002).

*Staphylococcus* enterotoksinleri (SE) genel olarak tekli polipeptid zincirlerden oluşur ve molekül ağırlıkları 25000-30000 dalton arasında değişir (Erol, 1999). Türlerin toksin oluşturma oranı büyüme oranı ve ortamdaki hücre konsantrasyonu ile ilişkili olarak gelişir. Optimum büyüme 37-40°C civarındadır. Optimum şartlar altında yaklaşık 4sa içinde gramda birkaç milyon hücre ve toksin oluşur (Ray, 1996).

*Staphylococcus* lar toprakta, suda, insan ve hayvanlar ile temas edebilecek her türlü ortamda bulunabilmektedir. Ancak esas kaynağı insanlar ve hayvanlar oluşturmaktadır. Gıdaların bu patojenlerle kontamine olmasında en büyük rolü insanların oynamasına karşın, başta mastitisli hayvanlardan sağlanan sütler olmak üzere kontamine hayvanlar büyük önem taşımaktadır. İnsan ve hayvanların normal deri ve mukoza florasını oluştururlar. *Staphylococcus* intoksikasyonlarında sıklıkla rastlanılan gıdalar arasında kontamine süt ve süt ürünleri ilk sıralarda yer almaktadır. Et ürünlerin içerisinde özellikle ısı işlem görmüş et ürünleri içeren sandviç vb. ürünler, starter kültür içermeyen ve uygunsuz koşullarda hazırlanan sucuklar riskli gıdalar grubunda yer almaktadır. Bu patojen ile kontamine gıdaların görünüm, koku ve lezzetinde anormal bir değişiklik olmamaktadır. Bu nedenle organoleptik olarak saptanmaları mümkün değildir (Erol, 1999).

#### **1.3.4. *Legionella* spp.**

*Legionella* genusuna ait bakteriler, sulu çevrelerde potansiyel sağlık riski oluşturan önemli bir bakteri grubudur. İlk izole edildiği tarih olan 1976' dan günümüze birçok Legionelloz vakası belirlenmiştir (Lye vd., 1997). İlk olarak etken patojen, salgından 6 ay kadar sonra CDC (Center of Disease Control) tarafından ölenlerin akciğer otopsislerinden tespit edilmiş olup, taksonomik olarak; *Legionellaceae* ailesine ait *Legionella pneumophila* adı verilmiştir (McDade vd., 1977). Salgının

incelenmesi sayesinde; hastalığın bulaşma yolları, prognozu, inkübasyon periyodu ve bakterinin temel özellikleri hakkında geniş bilgiler elde edilmiştir.

1947 yılında, ateşli akciğer infeksiyonuna yakalanan bir hastanın kanı denek hayvanına (*Guinea pig*) inoküle edilmiş ve saklanmıştır. Riketsiye benzeri bakteri olarak tanımlanan ajan patojenin *L.pneumophila* olduğu anlaşılmış ve ilk izole edilen *Legionella* bakterisi olarak tanımlanmıştır (McDade vd., 1979).

1974 yılının Eylül ayında, bir grup toplantısında pnömoni salgını meydana gelmiş, o gün için etken tesbit edilememiştir, yıllar boyunca saklanan serum örnekleriyle yapılan çalışmalar neticesi, etkenin *Legionella* olduğu tesbit edilmiştir (Terranova vd., 1978).

Bilinen ilk Lejyonella epidemisi ise; 1965 yılında, Washington DC’de psikiyatri hastanesinde (Elizabeth Hospital) 51 kişinin ateşli akciğer hastalığına yakalanması ve 15 kişinin ölmesi ile meydana gelmiştir. 12 yıl sonra yapılan geriye dönük çalışmalar sonucu hastaların %85’inde etkenin *L.pneumophila* olduğu anlaşılmıştır (Thacker vd., 1978).

Avrupa’da meydana gelen en büyük salgın Madrid’e yaklaşık 25km mesafede bulunan, Alcalá de Henares adlı bir İspanyol şehrinde meydana gelmiştir. 11 Eylül’de başlayıp, 18 Ekim 1996 tarihlerinde sona eren salgında etken *L.pneumophila* Tip 1 olup, kaynak çevredeki soğutma kuleleridir. Birçok vaka Pontiac ateşi şeklinde hastalığı geçirirken, 197 kişi pnömoniye yakalanmış, 11 vaka ölümle sonuçlanmıştır. Pnömoniye yakalananların 2/3’ü 60 yaş ve üzerinde olup, yaş ortalaması 68’dir. Vakaların 2/3’ü erkektir. 1985 yılında İngiltere’de bir hastanede (*Statford General Hospital*) salgın meydana gelmiş, hastane kaynaklı pnömoniye yakalanan 68 vakanın 22’si ölümle sonuçlanmıştır (Dondero vd., 1980).

Lejyoner hastalığında en önemli klinik bulgu pnömonidir. Hafif öksürük ve ateşten, komaya kadar gidebilen ve birçok organ yetmezliği ile kendisini gösteren, geniş bir yelpazeye sahiptir. İnkübasyon periyodu 2-10 gündür, immunosüpresif kişilerde süre genellikle kısa olmakla birlikte 20 güne kadar uzayabilmektedir. Hastalık ilk olarak, ateş, halsizlik, adale ağrıları, iştahsızlık ve baş ağrısı gibi basit bulgularla başlar. Nörolojik semptomlar; sırasıyla baş ağrısı ve ileri aşamada

ensefalopatidir. Mental durumdaki değişiklikler, genellikle nörolojik anormalliklere bağlıdır (Janet vd., 1997).

*Legionella*'ların neden olduğu diğer hastalık Pontiac ateşidir. Pontiac ateşisi, akut seyreden, antibiyotik tedavisi uygulanmasa bile kendi kendine iyileşen, grip benzeri bulgular gösteren, pnömoni ile seyretmeyen türüdür. İnkübasyon periyodu; 24-48 saattir. Legionelloz enfeksiyonları içerisinde görülme sıklığı %90-95 ve hatta üzerindedir. En sık semptomlar; halsizlik, adale ağrıları, ateş, üşüme, titreme ve başağrısıdır. Ayrıca balgamsız öksürük, baş dönmesi, mide bulantısı diğer şikâyetlerdir. Akciğer filminde patolojik bulgu yoktur. Bir hafta içerisinde kendiliğinden iyileşir (Türk Toraks Derneği, 2009).

*Legionella* enfeksiyonları sonucu gözlenen diğer bir hastalık ekstrapulmoner enfeksiyonlardır. Oldukça nadir görülen, akciğer harici enfeksiyonlar, genellikle bağışıklık sistemi çok zayıf kişilerde; zatürrenin yayılımcı komplikasyonu sonucu ortaya çıkar. Sinüzit, perirektal abse, perikardit, piyelonefrit, peritonit, pankreatit, prostetik kapak endokarditi ile yanık enfeksiyonları çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. *Legionella* ile kontamine su ile temizlik sonucu görülebilir (Türk Toraks Derneği, 2009).

*Legionellaceae* familyası üyesi olup; Gr (-) zorunlu aerobik basiller, 0,3-0,9mm eninde ve 2-20mm boyundadır. Hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, kuyruklu bakterilerdir. Doku ve klinik numunelerde kokobasil şeklinde 1-2mm boyunda görülürler. Gimenez boyası ile Gram boyama'ya göre daha iyi boyanırlar. *Legionella* bakterisi standart besiyerlerinde üremez. Üreyebilmesi için özel koşullar ve besiyerlerine ihtiyaç vardır. Charcoal yeast ekstrakt (pH 6,9) üremesi için primer besiyeri olup, besiyeri içerisinde çeşitli nutrientler, antibiyotikler ve mineraller eklenmelidir. *Legionella* bakterisi uygun ortam sağlandığı takdirde besiyerinde, makroskopik olarak 3-5 günde görülebilir hale gelir.

*Legionellaceae* ailesinin morfolojik karakteristiği ile ilgili olarak; jelatini sıvılaştırması, hippurat hidrolizi, oksidaz reaksiyonu,  $\beta$ -laktamaz aktivitesi, bromokrezol ve brom timol içeren besiyerinde mavi koloni oluşumuna neden olmasıdır.

*Legionellaceae* ailesinin genel biyokimyasal özellikleri: Hareketli olmaları, üreaz ve nitrataz enzimlerine sahip olmamaları ve katalaz (+) olmaları olarak sayılabilir.

*Legionella*' ya bağlı infeksiyonların, yaklaşık %71-85' inde etkenin *L.pneumophila* olduğu bildirilmiştir (Janet vd., 1997). Bu durum lejyoner hastalığının önemini ve uygun arama yöntemlerinin geliştirilmesi konusunu açıkça belirtmektedir. *Legionella* belirlenmesi ile ilgili günümüzdeki birçok gelişmeye karşın, yöntemler hala sorunlu ve zahmetlidir. RIA (Radioimmunoassay), ELISA, aglütinasyon testleri ve PCR teknikleri son yıllarda *Legionella* belirlenmesi için geliştirilen tekniklerdir (Mahbubani vd., 1990; Lye vd., 1997). Bu yöntemlerin bazılarının kültürel yöntemlere göre daha başarılı olduğu söylenebilirse de kültürel yöntemler halen geçerliliğini korumaktadır. Fakat kültürel yöntemlerin zaman alıcı olması, kültür ortamlarının özel, seçici ve katkıları içermesi ve tekniğın uygulanması için yüksek düzeyde profesyonellik gerekmesi gibi dezavantajları yüzünden kültürel yöntemlere alternatif yöntemler aranmaya devam edilmektedir.

Sağlıklı gıda ve su tüketimine ihtiyaç duyulan günümüzde gıda ve suların mikrobiyolojik olarak analiz edilmesi ve kalite kriterlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Gıda ve sularda bulunan mikroorganizmaların sayısı kültürel mikrobiyolojik yöntemler ile belirlenebilmektedir, fakat kültüre edilemeyen türlerin belirlenebilmesi ve daha hızlı sonuç alınabilmesi için farklı yöntemlerin kullanımına ihtiyaç vardır. Araştırmamızda, gıda ve sulardaki *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ve *Legionella*' nın belirlenmesi ve sayımı amacıyla 'Floresans *in situ* hibridizasyon' tekniğinin optimizasyonunun yapılması ve kullanılması; Aydın İli' ndeki büyük bir alışveriş merkezinden ve halk pazarlarından toplanan et örnekleri ve Aydın İli' ne kullanım suyu sağlayan su depolarından alınan su örneklerinin, 'FISH' ve 'kültürel mikrobiyolojik yöntemler' ile analizi ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması, FISH tekniğinin etkinliğinin, güvenilirliğinin ve uygulanabilirliğinin incelenmesi ve bu teknikle bakteri sayımı için gerekli olan en kısa sürenin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bakterilerin doğal ortamlarındaki kompozisyonları ve sayıları rRNA hedefli oligonükleotid probalar yardımıyla direkt olarak belirlenebilmektedir. rRNA gen fragmentleri ilk olarak 1989' da (DeLong vd., 1989) filogenetik işaret olarak kullanılmıştır. 1989' dan itibaren Floresans *In Situ* Hibridizasyon tekniği bakteri hücrelerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılmıştır (Amann vd., 2001).

Gıdalarda rRNA'yı hedef alan probalar, birçok *Enterococcus* türü (Betzl vd., 1990), *Listeria monocytogenes* (Wang vd., 1991) ve *Bacillus licheniformis* (Tatzel vd., 1994) için dizayn edilmiştir.

FISH tekniği, *Legionellaceae* familyasının üyeleri gibi, sulardaki yavaş gelişen bakterilerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Manz vd., 1995). Amann vd. (1995), Juretschko vd. (1998), Wagner vd. (1998), rRNA yaklaşımı ile bütün çevresel ve birçok klinik örnekte henüz kültüre edilemeyen bakteri ve *Archae'* lerin bol miktarda bulunduğunu ortaya koymuştur.

FISH tekniği sadece filogenetik grupların belirlenmesini değil aynı zamanda mikroorganizmaların doğal ortamlarındaki sayılarının belirlenmesini de sağlamaktadır. FISH tekniği, denizler, sulama kanalları gibi birçok farklı alanda mikrobiyal çeşitliliğin çalışılmasında uygulanmıştır (Llobet- Brossa vd., 1998).

Günümüzde, RNA hedefli nükleik asit problemleri olarak genellikle oligonükleotidler kullanılmaktadır. Polinükleotid problemlerin mi yoksa oligonükleotid problemlerin mi daha kullanışlı olduğu 1990'ların başından beri cevaplanamamış temel bir sorudur. Bu sorunun cevabı polinükleotid problemlerin okyanuslardaki planktonik *Archae* ve bakterilerin FISH ile görüntülenmesi ve sayılmasından sonra farklı bir boyut kazanmıştır (DeLong vd., 1999). DeLong vd. (1999) tarafından yapılan çalışmada florokrom işaretli poliribonükleotid problemler denizlerdeki planktonik bakterilerin sayımında kullanılmıştır. Bu çalışmada FISH tekniği ile, 3400m okyanus derinliğindeki planktonik hücrelerin tanımlanması ve sayımı yapılmıştır. Sonuçta, DAPI ile boyanarak belirlenmiş toplam hücre sayısının, bakteriyal ve arkeal problemler kullanılarak uygulanan FISH tekniği sayesinde %90-%100 oranında belirlenebildiği gösterilmiştir.

Daims vd. (1999; 2001), dijital görüntü analizleri ile mikrobiyal örneklerin kompozisyonlarını, işaretli problemlerin hedefi olan bakterilerin sayılarını ve ribozomal içeriklerini belirlemişlerdir. Diğer taraftan FISH yöntemi aynı anda farklı boyalarla işaretli problemlerle de uygulanmıştır (Stender vd., 2001). Bu yöntem, *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella spp.*, ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi indikatör bakterilerle çalışılmıştır.

FISH yönteminin, bakterilerin 16S rRNA' larındaki özel bölgeleri hedef alan oligonükleotid problemlerin kullanıldığı, çok çeşitli çevrelere uyarlanabilen, yeni, hızlı ve hassas tekniklerden biri olduğu ve kültürel yöntemlere göre olan bazı avantajları, Amann vd., (1995), Glockner vd., (1996), Lin ve Tsen, (1999), Regnault vd. (2000), Amann vd., (2001), Pernthaler vd., (2002), Ercolini vd., (2003), Blasco vd., (2003), Fang vd., (2003), Sekar vd., (2003), Bottari vd., (2006) ve Bertaux vd., (2007) tarafından açıklanmıştır.

FISH tekniğinin gıda ve su örneklerinde kullanımı, özellikle gıda kaynaklı patojenlerden olan *Staphylococcus* (Gory vd. 1999), *E.coli* (Regnault vd. 2000), *Salmonella* (Fang vd. 2003) genusları üzerinde yoğunlaşmıştır.

Oliveira ve Bernardo'nun 2002 yılında süt örneklerinde ve Blasco vd. nin 2003 yılında şarap örneklerinde yaptıkları çalışmalarda, FISH tekniği ile *Salmonella* aranmasında 7 saatin yeterli olduğu belirtilmiştir.

Gunasekera vd. (2003) 16S rRNA sekanslarını *Pseudomonas* genusuna özgü oligonükleotid prob geliştirilmesi için analiz etmişlerdir. 20 farklı *Pseudomonas* spp. ve 23 farklı genusa ait bakteri türü (negatif kontrol olarak) kullanılmıştır. Test edilen tüm *Pseudomonas* spp. pozitif FISH reaksiyonu vermekle beraber çok zayıf bir reaksiyon sinyali veren *Burkholderia cepacia* dışında hiçbir negatif kontrol FISH reaksiyonu vermemiştir. Sonuç olarak, farklı bakteri türlerinin bir karışımını içeren sütteki *Pseudomonas'* in, FISH tekniği ile kolayca belirlenebildiği bildirilmiştir. Aynı zamanda bu işlemin minimum 48 saatte sonuç alınabilen kültürel yöntemlere karşı 2sa içinde tamamlandığı da belirtilmiştir.

Ootsubo vd. (2003)' nin *Enterobacteriaceae* familyasına özgü prob ile yaptığı FISH çalışmasında, su ve çevresel örneklerde 24sa içerisinde sayım yapılabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada FISH tekniğinin süresinin kısaltılması amacıyla herbir basamak *E.coli* kültürü kullanılarak yeniden değerlendirilmiştir. Sonuçta, 5dk



fiksasyon ve 5dk hibridizasyon sonunda FISH veriminin %100' e ulaştığı ve toplam 1 saatin *E.coli* sayımı için yeterli olduğu açıklanmıştır. Fakat FISH yönteminin düşük sayıda hücreyi belirlemedeki zorluklar nedeniyle 0,45µm por çapındaki filtrelerin kullanımı, bakteriyel tayin limitinin artırılması amacıyla araştırılmıştır. Bu amaçla, filtre ile toplanan hücreler 6sa triptik soy agar içeren petrilere 37°C' de inkübe edilmiş ve ardından hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu durumda toplam analiz süresinin 7sa olduğu ve bakteriyel tayin limitinin >100 hücre/g olduğu bildirilmiştir.

Oliveira vd. tarafından 2004 yılında yapılan bir diğer çalışmada, FITC işaretli *Salmonella*' ya özgü prob ve rhodamin işaretli *L.monocytogenes*' e özgü prob kullanılarak, süt örneklerinde *Salmonella* spp. ve *L.monocytogenes* aranmıştır ve FISH tekniğinin ilgili bakteri türlerinde ortalama 5 gün içinde sonuç almayı sağlayan kültürel yöntemlere göre avantajları açıklanmıştır.

FISH tekniği ile belirlenebilen bakteri hücresi sayısı ile ilgili Waar vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, 20 yetişkin feçes örneği kullanılmış ve FISH tekniği ile belirlenebilen maksimum enterokok limiti 10<sup>7</sup>hücre/g olarak belirtilmiştir. Benzer diğer bir çalışmada FISH tekniğinin kültürel yöntemlere göre 10 kat fazla hücre belirleyebildiği belirtilmiştir (Bjergbaek ve Roslev, 2005).

Wilks ve Keevil (2006) tarafından yapılan çalışmada biyofilmlerde *Legionella* genusu çalışılarak *Legionella* genusuna ve *L.pneumophila* türüne özgü iki tane 16S rRNA hedefli prob dizayn edilmiştir. *Legionella*' nın 47 farklı suşu analiz edilmiştir ve tüm denemelerde *Legionella* spp. ve *L.pneumophila* başarı ile belirlenebilmiştir. Aynı çalışmada kültürel metodun *L. pneumophila* sayısının ancak %10' unu saptayabildiği belirtilmiştir. Bu da kültüre edilmesi zor olan türlerin FISH tekniği ile kompleks çevrelerde dahi uygulanabildiğini göstermektedir.

Vieira-Pinto vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada Sal3 probu ile uygulanan FISH tekniği ile domuz karkaslarının iç yüzeyinden alınan swablarda *Salmonella* aranmıştır. FISH tekniğinin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 235 tane doğal kontamine örnek, ISO 6579, VIDAS (Vitek Immuno Diagnostic Assay System)-SLM (*Salmonella*) sistemi ve FISH tekniği ile test edilmiştir. Kültürel metodla 39 örnekte pozitif sonuç bulunmuştur. Aynı örneklerde VIDAS ile sadece 23 pozitif örnek saptanırken FISH yöntemi ile 115 tane pozitif örnek bulunmuştur. Bu farkın

çok yüksek ( $P<0,001$ ) olduğu belirtilmiştir. Pozitif örneklerin 32 tanesi ayrıca kültürel yöntem ile doğrulanmıştır. Sonuçların FISH tekniğinin *Salmonella* aranmasında oldukça etkili ve hızlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada FISH yöntemi, kültürel yöntemlerle pozitif olduğu belirlenen 7 tane örneği belirlemede yetersiz kalmıştır. Çalışmada, birkaç örnekte özellikle *Salmonella* gibi az sayıda bulunan mikroorganizmaların görüntülenmesini engelleyebilecek olan arka plan floresansı gözlenmiştir. Bu nedenle, daha sonraki çalışmalarda örneğin fiksasyonundan önce hafif bir santrifüjleme veya filtrasyon basamağı eklenmesi önerilmiştir. Bu sayede arka plan floresansını etkileyen temel partiküllerin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.

Vieira-Pinto vd. (2008) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, Sal3 probu kullanılan 23S rRNA-FISH metodu *Salmonella* sp. aranmasında kullanılmış ve domuz etlerinden alınan örnekler aynı zamanda ISO 6579:2002 kültürel metodu ile de test edilerek karşılaştırma yapılmıştır. FISH yöntemi, hem doğal örnekler hem de ön-zenginleştirme işleminden geçirilmiş örneklere uygulanmıştır. Bu şekilde ön-zenginleştirme işleminin FISH tekniğinin performansındaki önemi de değerlendirilmiştir. Sonuçta, 235 tane örneğin 39 tanesinden ISO 6579:2002 kültürel yöntemi ile *Salmonella* izole edilmiştir. Buna karşın, 103 doğal örnekte ve 115 ön-zenginleştirme işleminden geçirilmiş örnekte FISH pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar, FISH tekniğinin domuz eti örneklerinde 7sa içerisinde pozitif *Salmonella* sonucu verebildiği ve tekniğin performansının ön-zenginleştirme işlemi ile arttığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Larsson vd., (2009)' nin su örneklerinde yaptığı çalışmada, FISH yöntemi ile belirlenebilen minimum hücre sayısının  $5\text{ hücre/ml}$  ye kadar düştüğü, toplam hücre belirleme aralığının ise  $1,105-8,83\text{ hücre/cm}^2$  olduğunu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, belirlenebilen *E.coli* düzeyinin FISH yöntemi ile kültürel yöntemle göre 100 kat fazla olduğu belirtilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Besiyerleri

Gıda ve sulardaki *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E.coli* ve *Legionella* cinslerine ait bakterilerin belirlenmesi için gerekli olan besiyerleri ve kimyasal maddeler ayrıntıları ile açıklanmıştır.

##### 3.1.1.1. Rappaport Vassiliadis (RVS) broth (Merck)

*Salmonella* aranmasında seçici zenginleştirme amacıyla kullanılmıştır.

Bileşimi: Soya Peptonu 4,5g/l; Magnezyum klorid heksahidrat 28,6g/l; NaCl 7,2g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,26g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,18g/l; malaşit yeşili 0,036g/l

Etki şekli: Besiyeri bileşiminde bulunan malaşit yeşili ve magnezyum klorür konsantrasyonları, benzeri diğer besiyerlerine göre daha azdır. Bu konsantrasyonlar, *Salmonella* 'nın 43°C' deki inkübasyon sırasında gelişmesini artıracak düzeyde tutulmuştur. Aynı amaçla besiyeri bileşiminde soya peptonu bulunmaktadır. pH' sının 5,2 olması bu besiyerinin seçici özelliğini artırır. Besiyerine 40mg/l olacak şekilde novobiosin katılmasının seçiciliği artıracak belirtilmektedir. Novobiosin filtre ile sterilize edilip, 45°C' ye soğutulmuş besiyerine ilave edilir.

Hazırlanması: Dehidre besiyeri 41,8g/l olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak çözülür, standart deney tüplerine 10' ar ml dağıtılır ve otoklavda 115°C' de 15 dk sterilize edilir. Otoklav sonrası 25°C' de pH 5,2±0,2' dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve koyu mavi renklidir.

##### 3.1.1.2. Muller – Kauffmann tetrathionate broth (MKTTn) (Merck)

*Salmonella* aranmasında seçici zenginleştirme amacıyla kullanılmıştır.

Bileşimi: Et ekstraktı 0,9g/l; et peptonu 4,5g/l; maya ekstraktı 1,8g/l; NaCl 4,5g/l; CaCO<sub>3</sub> 25g/l; sodyum tiosülfat 40,7g/l; öküz safrası 4,75g/l

Etki şekli: Tetrasyonat, besiyerindeki tiosülfattan iyot ilavesi sonunda oluşur. Tetrasyonat koliform ve diğer pek çok enterik bakterinin gelişmesini baskılamak, *Salmonella*, *Proteus* ve diğer bazı bakteriler tetrasyonatı indirgeyerek olumsuz etkisinden kurtulurlar. Besiyerinin bileşiminde bulunan kalsiyum karbonat, tetrasyonatın indirgenmesi sırasında ortaya çıkan sülfirik asidi nötralize eder. Safra tuzları *Salmonella*'nın gelişmesini teşvik ederken özellikle Gram pozitif refakatçi floranın gelişimini engeller.

Hazırlanması: Dehidre bazal besiyeri 82g/l olacak şekilde distile su içinde eritilir, yavaşça ısıtılarak kaynama noktasına getirilir ve hızla soğutulur. Kullanımdan önce 20ml/l olacak şekilde iodye/potasyum iodyid çözeltisi ve %0,1 'lik brilliant green çözeltisinden 10ml/l olacak şekilde ilave edilip karıştırılır, steril tüplere ya da erlenlere dağıtılır. Katkıları ilave edilmiş besiyeri aynı gün kullanılmalıdır. İodye/potasyum iodyid çözeltisi hazırlanması için 20ml distile su içinde 5g potasyum iodyid ve 4g iyot eritilir. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve yeşil olup, 25°C' de pH' sı 7,6±0,2' dir.

### 3.1.1.3. XLD agar (Ksiloz Lizin Deoksikolat Agar) (Merck)

*Salmonella* aranmasında seçici ve ayırdedici katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Maya ekstraktı 3,0g/l; NaCl 5,0g/l; D(+) Ksiloz 3,75g/l; Laktoz 7,5g/l; Sukroz 7,5g/l; L(+) lizin 5,0g/l; Sodyum deoksikolat 1,0g/l; Sodyum tiosülfat 6,8g/l; Amonyum demir (III) sitrat 0,8g/l; Fenol kırmızısı 0,08g/l; Agar-agar 14,5g/l

Etki şekli: Besiyeri bileşiminde bulunan tiosülfat ve demir tuzu ile hidrojen sülfür oluşumu, ksiloz ve/veya laktoz ve/veya sakkarozun kullanımı pH indikatörü olan fenol kırmızısı ile belirlenir. Lizinin dekarboksilasyonu ile kadeverin (C<sub>1</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>) oluşması koloni etrafındaki pH yükselmesine bağlı olarak menekşe renkli bir zon ile görülür. Bu besiyerinin refakatçi flora üzerinde zayıf bir inhibitör etkisi vardır. *Salmonella* kolonileri besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli olurlar. *Shigella*, *Providencia*, *Pseudomonas* kolonileri de besiyeri ile aynı renkte ve yarı saydamdır ancak bunlarda siyah merkez oluşmaz. Sarı ve sarı zonlu koloniler koliform grup bakteriler, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Proteus* ve *Hafnia* kolonileridir. Ksiloz pozitif olan *Salmonella typhosa* bu besiyerinde portakal rengi ve hafif opak koloniler oluşturur.

Hazırlanması: 50ml damıtık su içine 55,0g/l dehidre besiyeri ilave edilir, karıştırılır ve üzerine 950ml damıtık su eklenir. Karıştırılır ve agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutulur, hızla 45–50°C' ye soğutulup steril petri kutularına 12,5' er ml dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir, 25°C' de pH' sı 7,4±0,2'dir.

#### 3.1.1.4. Bizmut sülfat agar (BSA) (Merck)

*Salmonella* aranmasında seçici ve ayırdedici katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Et ekstraktı 5,0g/l; Et peptonu 10,0g/l; D(+) Glikoz 5,0g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,0g/l; Demir(III) sülfat 0,3g/l; Brilliant green 0,025g/l; Bizmut sülfat indikatörü 8,0g/l; Agar-agar 15,0g/l

Etki şekli: Bileşimde bulunan brilliant green ve bizmut refakatçi floranın gelişimini baskımlarken bizmut iyonlarının metalik bizmuta indirgenmesi koloni etrafında metalik bir parlaklık oluşturur. Siyah merkezli etrafında metalik bir parlaklık olan siyah çöküntülü zon bulunan koloniler tipik *Salmonella* kolonileridir. Küçük, yeşil-kahverengi, bazen mukoid olanlar ise koliform grup bakteriler ve *Serratia* ile *Proteus* kolonileridir. BSA kullanılmadan 1 gün önce hazırlanmalı ve karanlıkta saklanmalıdır.

Hazırlanması: Dehidre besiyeri 47,5g/l olacak şekilde damıtık su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda karıştırılarak eritilir ve steril Petri kutularına 25' er ml olacak şekilde kalın bir tabaka halinde dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve yeşil renklidir. pH' sı 25°C' de 7,6±0,2'dir. Taze hazırlanmalıdır.

#### 3.1.1.5. Baird-Parker agar (BPA) (Merck)

*Staphylococcus aureus* için seçici ve ayırt edici besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Kazein pepton 10,0g/l; Et ekstraktı 5,0g/l; Maya ekstraktı 1,0g/l; Sodyum piruvat 10,0g/l; Glisin 12,0g/l; Lityum klorid 5,0g/l; Agar-agar 15,0g/l

Etki şekli: Siyah merkezli etrafında metalik bir parlaklık olan siyah çöküntülü zon bulunan koloniler tipik *Salmonella* kolonileridir. Küçük, yeşil-kahverengi, bazen mukoid olanlar ise koliform grup bakteriler ve *Serratia* ile *Proteus* kolonileridir. Bununla beraber *Proteus* kolonileri sıklıkla *Salmonella* kolonileri ile karıştırılmaktadır. Bileşimde bulunan brilliant green ve bizmut refakatçi floranın gelişimini baskılayarak bizmut iyonlarının metalik bizmuta indirgenmesi koloni etrafında metalik bir parlaklık oluşturur. Taze hazırlanmış besiyeri refakatçi flora üzerinde yoğun inhibisyon etkisi gösterirken *Salmonella* kolonileri etrafında metalik parlaklık 48sa inkübasyondan sonra oluşur. BPA kullanılmadan 1 gün önce hazırlanmalı ve karanlıkta saklanmalıdır.

Hazırlanması: 58,0g dehidre besiyeri 950ml damıtık su içinde 1-2 dk kaynatılarak tümüyle çözündürülür ve otoklavda 121°C' de 15dk sterilize edilir. Bazal besiyeri 45°C' ye soğutulur ve manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılırken üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50ml yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu eklenip, steril Petri kutularına 12,5' er ml dökülür. Hazırlanmış besiyeri yanardöner sarımsı-kahve renkte olup 25°C' de pH 6,8±0,2' dir. Petri kutuları streç filmle sarılarak buzdolabında 1 ay depolanabilir.

### **3.1.1.6. Brain heart infusion (BHI) broth (Merck)**

*S. aureus* kanıtlama testlerinde genel sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Nutrient Substratı (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5g/l; D(+) Glukoz 2,0g/l; NaCl 5,0g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5g/l

Hazırlanması: Dehidre besiyeri, 37,0g/l olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilip, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtılır ve otoklavda 121°C' de 15dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25°C' de pH 7,4±0,2' dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahverengidir.

### **3.1.1.7. Lauril sülfat triptoz (LST) broth (Merck)**

*E.coli* nin EMS yöntemi ile sayılması için selektif sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Triptoz 20,0g/l; Laktoz 5,0g/l; NaCl 5,0g/l; Sodyum Lauril sülfat 0,1g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,75g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,75g/l

Etki şekli: Besiyeri bileşiminde bulunan lauril sülfat refakatçi floranın gelişimini baskımlarken yüksek düzeyde bulunan besin maddeleri ve fosfat tampon "laktozu yavaş kullanan" koliform bakterilerin dahi hızlı gelişimini ve fazla miktarda gaz çıkışını sağlar. İnkübasyon sonunda gelişme saptanan tüplerde gaz çıkışı Durham tüplerinde gaz birikmesi ile belirlenir. Koliform grup bakterilerin analizi ile ilgili uluslararası standartlara göre, inkübasyon sonunda gaz görülen tüplerden doğrulama için Brilliant Green 2% Bile Broth besiyerine ekim yapılması gerekir.

Hazırlanması: Dehidre besiyeri 35,6g/litre olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10' ar ml dağıtılıp otoklavda 121°C' de 15dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25°C' de pH 6,8±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir.

### 3.1.1.8. *E. coli* (EC) broth (Merck)

*E. coli* için selektif sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Kazein pepton 20,0g/l; Laktoz 5,0g/l; Safra tuzları karışımı 1,5g/l; NaCl 5,0g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,0g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5g/l

Etki şekli: Bileşimdeki safra tuzları, başta Gram pozitif bakteriler olmak üzere refakatçi florayı baskılar. Yüksek inkübasyon sıcaklığında sadece fekal koliformlar laktozdan gaz oluşturabilir.

Hazırlanması: Dehidre besiyeri 37,0g/l konsantrasyonda olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan deney tüplerine 10' ar ml dağıtılıp otoklavda 121°C' de 15dk sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25°C' de pH 6,9±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı-kahve renktedir. 44,5–45,5°C' de 24sa (gerekirse 48sa) süre ile inkübe edilir. Bu sürenin sonunda gelişme ve Durham tüplerinde gaz görülen tüpler pozitif olarak işaretlenir ve standart EMS çizelgesinden örnekteki fekal koliform sayısı hesaplanır.

### 3.1.1.9. Tripton water (TW) (Merck)

Şüpheli *E.coli* kolonilerinin kanıtlanması için yapılan indol testi için kullanılmıştır.

Bileşimi: Kazein pepton 10,0g/l; NaCl 5g/l

Etki şekli: Bileşimde buluna kazein peptonu (tripton) yüksek miktarda triptofan içerir. Triptofan, indol pozitif mikroorganizmalar tarafından parçalanır ve ortaya çıkan indol, Kovaks ayırıcı ile belirlenir.

Hazırlanması: Dehidre besiyeri, 15,0g/l olacak şekilde damıtık su içinde çözülür, tüplere 10' ar ml dağıtılıp otoklavda 121°C' de 15dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsıdır, 25°C' de pH'sı 7,3±0,2'dir.

### **3.1.1.10. Legionella GVPC agar (Oxoid)**

*Legionella* gelişimi için kullanılmıştır.

Bileşimi ve hazırlanması: 1 paket dehidre besiyeri bazı (aktif kömür 3,0g/l; maya ekstraktı 9,0g/l; agar 13,0g/l) 440ml distile su içinde eritilip otoklavda 121°C' de 15dk sterilize edilip 50°C' ye soğutulur. 1 şişe BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) ve gelişme katkısı (ACES tamponu 5,0g; ferik pirofosfat 0,125g; sistein-HCl 0,2g; α-ketoglutarat 0,5g) 50ml steril distile su içinde eritilir. 1 şişe GVPC (glisin 1,5g; vankomisin-HCl 0,5g; Polimiksin B-sülfat 39.600 I.E.; sikloheksimid 40mg) selektif katkısı 10ml steril distile suda eritilir. GVPC agar besiyeri yapmak için hazırlanan besi yerleri karıştırılır, Petri kutularına dökülür. İnkübasyon mikroaerofilik koşullarda yapılır. Hazırlanmış besiyerinin pH' sı 25°C' de 6,9±0,2' dir.

### **3.1.2. Kimyasal Malzemeler ve Çözeltiler**

#### **3.1.2.1. Hibridizasyon tamponları**

Manz vd., (1992)' ne göre hazırlanan hibridizasyon tamponlarının final iyon konsantrasyonları; 0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl ve %0.01 SDS dir.

#### **3.1.2.2. Yıkama tamponu**

Manz vd., (1992)' ne göre hazırlanan yıkama tamponunun final iyon konsantrasyonları; 4,5M NaCl, 0,5M EDTA, 200mM Tris-HCl (Ph: 7,2) ve %10



SDS' dir. Bağlanmayan veya özgül olmadan bağlanan problemlerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.

### **3.1.2.3. Düşük konsantrasyonlu TE (Tris-EDTA) tamponu**

Final iyon konsantrasyonu, 10mM Tris; 0,1mM EDTA (pH: 8)' dir. Problemlerin çözülmesi ve stok solüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır.

### **3.1.2.4. Lizozim solüsyonu**

Lizozim (Fermentas) solüsyonu, Tris-HCl tamponu (10mM Tris; 1mM EDTA (pH: 6,5)) içerisinde, 10mg/ml konsantrasyonda olmak üzere hazırlanarak bakteri hücre duvarının geçirgenleştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.2.5. PBS (Tamponlanmış fizyolojik tuzlu su)**

Final iyon konsantrasyonu; 137mM NaCl, 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 2,68mM KCl, 1,47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 7,4) olan PBS hücrelerin yıkanmasında kullanılmıştır.

### **3.1.2.6. Paraformaldehit (PFA) solüsyonu**

Pernthaler vd. (2001)' e göre hazırlanan %4 konsantrasyondaki paraformaldehit solüsyonu, 0,4g paraformaldehitin (Oxoid) 10ml PBS içinde çözülmesi ile taze olarak hazırlanmıştır. Hücrelerin fikse edilmesinde kullanılmıştır.

### **3.1.2.7. DAPI (4, 6-diamino-2-fenillindol) solüsyonu**

DAPI (Molecular Probes) stok solüsyonu (5mg/ml veya 14,3mM) DMF (dimetilformamid) içerisinde hazırlanmış ve -20°C' de saklanmıştır. DAPI çalışma solüsyonları ise PBS içerisinde 1mg/ml konsantrasyonda taze olarak hazırlanmış ve alüminyum folyoya sarılı bir şekilde +4°C' de saklanmıştır.

### **3.1.2.8. EDTA' lı liyofilize tavşan plazması (BD)**

şüpheli *S.aureus* kolonilerinin kanıtlanması amacıyla kullanılmıştır.

### 3.1.2.9. PoliA-I ve Vi antiserumları (Difco)

Şüpheli *Salmonella* kolonilerinin kanıtlanması amacıyla kullanılmıştır.

### 3.1.3. Referans Bakteri Kültürleri ve Floresans İşaretli Oligonükleotid Problar

#### 3.1.3.1. Referans bakteri kültürleri

Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Safe Spice Gıda Analiz Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan sağlanan referans bakteri kültürleri kullanılmıştır.

- a) *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
- b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- c) *E.coli* ATCC 35218
- d) *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- e) *Bacillus mycoides* ATCC 10206
- f) *Legionella pneumophila* 5854

#### ***Referans bakteri kültürlerinin kullanılması ve saklanması***

Referans suştan tek alt kültür yapılarak referans stok kültür elde edilmiştir. Referans stokların birden fazla sayıda sıvı kültürü hazırlanarak bu kültürler derin dondurucuda (-70°C) ve liyofilize edilerek korunmuştur. Referans stoktan çalışma kültürleri hazırlanmıştır. Çalışma kültürlerinden alt kültür yapılmamıştır. Bununla beraber, çalışma kültürleri uygun depolama koşullarında bir haftadan daha uzun olmamak kaydı ile saklanmış ve çapraz kontaminasyonlara ve nitelik kaybına neden olmayacak şekilde kullanılmıştır.

### 3.1.3.2. Floresans işaretli oligonükleotid problemler

Floresans işaretli oligonükleotid problemler ProbeBase veritabanı kullanılarak seçilmiş ve Genosys Biotechnologies, Inc.' den sağlanmıştır. Floresans işaretli oligonükleotid problemlerin özellikleri Ek 2' de verilmiştir.

#### *Floresans işaretli oligonükleotidlerin kullanılması ve saklanması*

Üretici firma, floresans işaretli oligonükleotid problemleri, HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) saflığında ve liyofilize halde sağlamıştır. Problemlerin tamamı FITC floresans boyasıyla işaretlenmiştir. FITC, DNA' nın çift sarmalını boyayarak, 494nm eksitasyon ve 517nm emisyon dalga boyuna sahip ışık altında yeşil sinyal vermektedir.

Problemler 500ng/ml stok konsantrasyonunu sağlamak amacıyla, düşük konsantrasyonlu TE tamponu içinde çözülmüştür. Çözülen problemler, küçük miktarlara ayrılarak, -20°C' de ve karanlıkta son kullanma tarihine kadar saklanmıştır. Problemler kullanılmadan önce oda sıcaklığında çözündürülmüştür.

Tüm FISH çalışmalarında üniversal EUB338 probe, tüm bakterileri hibridize etmek için, hibridizasyon deneylerinin pozitif kontrolü olarak kullanılmıştır. Hiç bir bakterinin rRNA' sı ile hibridize olmayan NonEUB338 probe spesifik olmayan bağlanmaların kontrolü için ve probe içermeyen kontrol otofloresansın kontrolü için olmak üzere hibridizasyon deneylerinin negatif kontrolleri olarak kullanılmıştır.

### 3.1.3.3. Floresans sabitleyici ortam (Vectashield)

Üretici firma tarafından gliserol bazlı olarak sağlanan ortam, mikroskopik incelemeler sırasında floresansın çabuk yok olmasını engellemek ve görüntü netliğini artırmak amacıyla kullanılmıştır. Bu sayede, hazırlanan preparatlar haftalarca saklanabilmektedir. Daha uzun süreli saklamalar için ise lamellerin etrafı tırnak cilası ile kapatılmıştır.

#### **3.1.3.4. Polikarbonat membran filtre (Sartorius Stedim Biotech)**

Filtre bazlı FISH yönteminin 4 farklı uygulaması bulunmaktadır. Ayrıntıları 3.2.2.2.' de verilen bu uygulamalarda, 13mm çapında, 0,45µm por çapında standart filtreler ve yüksek saflıktaki polikarbonattan yapılmış, 25mm çapında ve 0,20µm por çapında membran filtreler kullanılmıştır. Filtreler otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **3.1.3.5. Filtre tutucu aparat (Sartorius Stedim Biotech)**

Polikarbonat membran filtreler için özel olarak tasarlanan ve otoklavlanarak steril edilebilen polikarbonat filtre tutucu filtrasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

#### **3.1.4. Araştırma Materyalleri**

Bu çalışmada araştırma materyali olarak, Aydın İli' nde bulunan büyük bir alışveriş merkezi marketinden ve Aydın' daki halk pazarlarından alınan tavuk ve dana eti örnekleri ile Aydın İl' inde Aytepe, Nazırlar, Askeriye ve Aydın atık su arıtma tesisleri, Kemer mevki, Mimar Sinan Mahallesi su depoları ve İzmir Ege Serbest Bölge' sindeki su dağıtım şebekelerinden alınan çıkış suyu örnekleri kullanılmıştır Ek 1' de araştırma materyallerinin örnekleme tarihleri, alındıkları yerler ve kullanılan kodların açıklamaları verilmiştir. Her bir örnekte aranan bakteri grupları, kullanılan probalar ve incelenen örnek sayıları ise Çizelge 3.1.' de belirtilmiştir.

Örnek toplama ve izolasyon işlemleri 1 yıllık bir zaman periyoduna yayılmıştır. Örnekler aseptik koşullar altında laboratuvara getirilmiş ve izolasyon işlemine geçilmiştir. Alınan örnekler 6sa içinde laboratuvara ulaştırılarak ekimleri yapılmıştır.

Çizelge 3.1. İncelenen örnekler, örnek sayısı, aranan bakteriler ve kullanılan problemler

Araştırma materyali		İncelenen örnek sayısı	Aranan bakteri	Kullanılan işaretli oligonükleotid prob
Et ürünleri	Tavuk etleri	50	<i>Salmonella spp.</i>	Sal3 (Nordentoft vd., 1997)
			<i>E.coli</i>	ECO1167 (Neef vd., 1995)
			<i>S.aureus</i>	Sau (Kempf vd., 2000)
	Dana kıyma	50	<i>Salmonella spp.</i>	Sal3 (Nordentoft vd., 1997)
			<i>E.coli</i>	ECO1167 (Neef vd., 1995)
			<i>S.aureus</i>	Sau (Kempf vd., 2000)
Su	Su depoları	100	<i>Legionella spp.</i>	Leg 705 (Manz vd., 1995)
			<i>E.coli</i>	ECO1167 (Neef vd., 1995)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Gıda ve Su Örneklerinin Hazırlanması

Araştırma materyallerinin floresans işaretli problemlerle yapılan *in situ* hibridizasyon analizleri sonucunda oluşabilecek arka plan floresansın önlenmesi amacıyla, örnekler ön temizleme işleminden geçirilmiştir.

#### 3.2.1.1. Gıda örneklerinin hazırlanması

Gıda örneklerinden 25'er gram alınarak, 225ml 1X PBS içinde karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Daha sonra suspansiyon düşük hızda (1000g, 1dk) santrifüjlenerek katı parçacıklardan ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant kurutma kağıdından geçirilerek süzülüş ve süpernatant santrifüjlenmiştir (10 000g, 10dk). Pelletler bir araya toplanarak tekrar santrifüjlenmiştir (10 000g, 10dk). Süpernatant atılarak, pellet 10ml 1X PBS içinde çözülüştür. Hazırlanan örnekler fiks edilerek -20°C' de saklanmıştır.

### 3.2.1.2. Su örneklerinin hazırlanması

Tang vd., (2005)' ne göre, sularda *Legionella* genusuna ait bakteriler aranırken, analizin hassasiyetini artırmak için su örnekleri yoğunlaştırılmıştır. Bu amaçla su örnekleri filtreden geçirilerek süzümüştür. Filtratlar daha sonra 4000g' de 15dk santrifüjlenmiştir. Pellet, 10ml 1X PBS içinde tekrar süspande edilmiş ve santrifüjlenmiştir (10 000g, 10dk). Pellet 5ml PBS içinde tekrar süspande edilmiştir. Hazırlanan örnekler fikse edilerek -20°C' de saklanmıştır.

### 3.2.2. FISH Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

#### 3.2.2.1. FISH yönteminin uygulanması

FISH yöntemi prosedüründe 3.2.3' de ayrıntıları açıklanan altı ana basamak bulunmaktadır. Bunlar; Hücrelerin toplanması, fiksasyon, hücrelerin geçirgenleştirilmesi, hibridizasyon, yıkama ve mikroskopik incelemedir.

#### 3.2.2.2. FISH yönteminin farklı uygulamalarının karşılaştırılması

FISH tekniğinin farklı uygulamaları bulunmaktadır. Bu uygulamaların birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemlerin karşılaştırılması amacıyla, *S.typhimurium* ATCC 14028, *E.coli* ATCC 35218 ve *S.aureus* ATCC 25923 bakteri suşlarının NA (nutrient agar) da saf kültürleri hazırlanmıştır. Bu kültürlerden öze ile alınarak PBS içerisinde süspande edilmiş ve karışım Mc Farland 0,5' e göre ayarlanarak  $10^7$ - $10^8$ kob/ml canlı bakteri hücreleri elde edilmiştir. Bu süspansiyon  $10^{-6}$ ' ya kadar seyreltilmiştir ve sayım için  $10^{-5}$ ' lik seyreltme kullanılmıştır. Literatürlerden (Pernthaler vd., 2001; Kenzaka vd., 1998; Joachimsthal vd., 2003) elde ettiğimiz hibridizasyon sıcaklıklarına bağlı kalarak, *S.typhi* için 37°C' de, *E.coli* için 47°C' de ve *S.aureus* için 43°C' de hibridizasyon sonunda sayım yapılmıştır. Elde edilen sayının,  $10^7$ - $10^8$ kob/ml' ye yakınlığına göre yorum yapılmıştır.

#### **Lam üzerinde FISH**

Manz vd. (1992) tarafından geliştirilen lam üzerinde FISH tekniğinde, 1/3 oranında fiksatif (%4 paraformaldehit) kullanılır. Karışım +4°C' de, 3sa,

karanlıkta inkübe edilir ve 5000g' de fiksatif uzaklaştırmak amacıyla santrifüjlenir. Hücreler 1X PBS ile yıkanır, suspande edilir ve 2 kez santrifüjlenir. Fiksasyonun tamamlanması için 1 hacim (v/v) 70% lik soğuk etanol eklenir. Daha sonra fikse edilmiş hücrelerden 10 $\mu$ L alınarak lama yayılır, gece boyunca kurutulur ve 50%, 80%, ve 96% etanol serileri içinde 3' er dk tutularak dehidre edilir. Hibridizasyon için, 9 $\mu$ L hibridizasyon tamponu, 1 $\mu$ L prob (25ng/ $\mu$ L) ile karıştırılarak lamlara eklenir. Lamlar, 2-18 sa uygun sıcaklıkta hibritleştirildikten sonra yıkama tamponu ile yıkanır. Yıkama işleminde lamlar, 50ml yıkama tamponu içinde, bakteriye uygun hibridizasyon sıcaklığında, 20dk boyunca bekletilir. Daha sonra lamlar kısa bir süre steril deiyonize su içinde bekletilir. Yıkanan lamlar karanlık ortamda kurutulur ve 1 $\mu$ L floresans koruyucu ortam eklenerek mikroskop altında incelenir.

### ***Filtre üzerinde FISH***

#### **a. Filtre üzerinde hibridizasyon**

Tortorello ve Reineke, (2000)' ye göre yapılan denemede örnek önce solüsyon içinde fikse edilmiş ve daha sonra materyali filtrenin yüzeyinde toplamak ve yoğunlaştırmak amacıyla 13mm çaplı, 0,45 $\mu$ m por çaplı filtreden geçirilmiştir. Fiksasyon sırasında lam üzerinde FISH protokolünde kullanılan santrifugasyon işlemi bu protokolda filtrasyonla yer değiştirmiştir. PBS ve deiyonize su fazla fiksatif temizlemek amacıyla filtreden geçirilmiştir. 150 $\mu$ L, 10ng/ $\mu$ L konsantrasyonda prob içeren hibridizasyon tamponu filtreye eklenip ve filtre 46°C' de 2-18 sa inkübe edildikten sonra TE tamponu ile yıkanmış ve havada kurutulup ve mikroskop altında incelenmiştir.

#### **b. Filtre üzerinde fiksasyon ve hibridizasyon**

Glockner vd., (1996)' ne göre yapılan denemede örnek direkt olarak 13mm çaplı, 0,45 $\mu$ m por çaplı filtreden geçirilmiş ve filtre %4 fiksatif ile kaplanarak 30dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Fiksatif vakum ile uzaklaştırılmış ve 3ml PBS ve deiyonize su filtreden geçirilerek tüm fiksatifin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Havada kurutulan filtreler bir lama koyularak 50ng prob içeren hibridizasyon tamponu ile kaplanmıştır. 46°C' de 90dk nemli ve daha önceden ısıtılmış inkübatör içinde hibritleştirilen lam üzerindeki örnekler, 50ml daha önceden ısıtılmış yıkama tamponu içine daldırılmış ve 48°C' de 15dk beklenerek

yıkanmıştır. Filtre kağıtları Whatman 3M (Whatman Ltd., Maidstone, UK) kağıdı üzerinde kurutulup floresans koruyucu ortam ile lamalar üzerine sabitlenerek floresans mikroskop altında incelenmiştir.

c. Filtre üzerinde fiksasyon, hibridizasyon ve yıkama

Glockner vd., (1996) ' ne göre yapılan denemede örneğin tüm işlemleri filtre üzerinde gerçekleştirilmiş, filtre sadece görüntüleme sırasında lamin üzerine koyulmuştur. Örnek 13mm çaplı, 0,45µm por çaplı filtreden geçirilip filtre %4 fiksatif ile kaplanarak 30dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Fiksatif vakum ile uzaklaştırılıp, 3ml PBS ve deiyonize su filtreden geçirilerek tüm fiksatifin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Filtre 50ng prob içeren hibridizasyon tamponu ile kaplanmış ve 46°C de 90dk boyunca, nemli ve daha önceden ısıtılmış inkübatör içinde hibritleştirilmiştir. Filtreye daha önceden ısıtılmış yıkama tamponu eklenmiş ve 48°C' de 15dk beklenerek yıkanmıştır. Filtre 3ml PBS ve deiyonize su ile vakum altında yıkanıp havada kurutulmuş ve floresans koruyucu ortam ile lamalar üzerine sabitlenerek floresans mikroskop altında incelenmiştir.

d. Solüsyon içerisinde fiksasyon, hibridizasyon ve filtre üzerinde konsantrasyon

Heidelberg vd., (1993)' ne göre yapılan denemede, %4 konsantrasyonda paraformaldehit solüsyonu ile örnekler fikse edilmiştir. Karışım +4°C' de 3sa inkübe edilip 100µl lizozim çözeltisi (10mg/ml) eklenerek oda sıcaklığında 30dk inkübe edilmiştir. Hücreler yıkanarak 10µl hücre solüsyonu alınmış ve bir mikro santrifüj tüpünde hibridizasyon tamponu ve prob ile karıştırılarak uygun sıcaklıkta 2-18sa hibritleştirilmiştir. Hibridize olmuş örnek üzerine PBS eklenmiş ve 25mm çapında ve 0,20µm por çapında olan polikarbonat filtreden geçirilerek yıkanmış ve floresans koruyucu ortam eklenerek floresans mikroskopta incelenmiştir.

**3.2.2.3. Floresans işaretli problemlerin hibridizasyon sıcaklıklarının optimizasyonu**

3.2.2.2.' de açıklanan beş farklı FISH uygulaması arasında, örneğin solüsyon içerisinde fikse ve hibridize edildiği ve filtre üzerinde konsantre edildiği, Heidelberg vd. (1993)' nin uyguladığı tekniğin en uygun yöntem olduğuna karar verilip araştırmamızın diğer aşamalarında bu uygulama kullanılmıştır. Bu uygulamanın bazı basamakları literatür çalışmalarına göre değiştirilmiştir. FISH



yöntemi protokolü 3.2.3.' de ayrıntıları ile açıklanmıştır. Probların hibridizasyon sıcaklıklarının optimizasyonu amacıyla daha önce yapılmış çalışmalara (Pernthaler vd., 2001; Kenzaka vd., 1998; Joachimsthal vd., 2003) bağlı olarak 12 farklı hibridizasyon sıcaklığı (25°C, 27°C, 30°C, 35 °C, 37 °C, 39 °C, 40°C, 41 °C, 43 °C, 45 °C, 47 °C, 50 °C) denenmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucunda floresans sinyalin görsel şiddetine göre probların hibridizasyon sıcaklıkları belirlenmiştir. Belirlenen hibridizasyon sıcaklıkları Çizelge 4.1.' de verilmiştir.

#### **3.2.2.4. Floresans işaretli probların özgüllüklerinin araştırılması**

##### ***Floresans sinyalin incelenmesi ile probların özgüllüklerin araştırılması***

Probların hedef rRNA sekanslarına uygun olarak seçilen, karışık bakteri kültürleri hazırlanmıştır. FISH uygulanması sonucunda, floresans sinyalin varlığı/yokluğu ve sinyalin kullanılan bakteriye olan özgüllüğü incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan bakteri kültürleri Çizelge 4.2.' de ve bu kültürlerle yapılan hibridizasyon sonucunda epifloresans mikroskopta elde edilen fotoğraflar, Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.' da verilmiştir.

##### ***Bakteri sayımı ile probların özgüllüklerin araştırılması***

Bu amaçla, *S.typhimirium* ATCC 14028, *S.aureus* ATCC 25923 ve *B.mycoides* ATCC 10206 in NA' da *L.pneumophila* 5854 ün ise BCYE agarda saf kültürleri hazırlanmıştır. Bu kültürlerden öze ile alınarak PBS içerisinde suspanse edilmiş ve karışım Mc Farland 0.5' e göre ayarlanarak  $10^7$ - $10^8$  kob/ml canlı bakteri hücresi elde edilmiştir. Bu süspansiyon  $10^{-6}$ 'ya kadar seyreltilmiş ve sayım için  $10^{-5}$ ' lik seyreltme kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları ile elde edilen uygun sıcaklıkta hibridizasyon sonunda sayım yapılmıştır. Elde edilen sayının,  $10^7$ - $10^8$  kob/ml' ye yakınlığına göre yorum yapılmıştır. Bakteri sayımı ile probların özgüllüklerin araştırılması amacıyla hazırlanan süspansiyonların içerdiği hücre sayıları ve FISH tekniği ile elde edilen ortalama sayım sonuçları Çizelge 4.3.' de verilmiştir.

#### **3.2.3. FISH Yöntemi Protokolü**

**a- Hücrelerin toplanması:** 10ml 1X PBS içinde çözülerek hazırlanan örnekler 10 000g de 10dk santrifujlenerek, hücreler toplanmıştır (Heidelberg vd., 1993).

**b- Fiksasyon:** Pernthaler vd., (2001) tarafından önerilen yöntem göre, 250µl örnek 13 000g' de 3dk santrifüjlenmiş ve üst faz atılmıştır. PBS eklenerek örnek karıştırılmış ve karışım tekrar 13 000g' de 3dk santrifüjlenmiştir. Üst faz atıldıktan sonra 3 hacim %4 PFA solüsyonu eklenmiş ve karışım en az 3sa, +4°C' de inkübasyona bırakılmıştır.

**c- Hücrelerin geçirgenleştirilmesi:** Fikse edilen örnekler santrifüjlendikten sonra 100µl lizozim çözeltisi (10mg/ml) eklenerek oda sıcaklığında 30dk inkübe edilmiştir. Tespit ve geçirgenleştirmeden sonra hücreler yıkanmış ve örnekler PBS ve etanol (1:1, v/v) karışımı eklenerek karıştırılmıştır (Furukava vd., 2006).

**d- Hibridizasyon:** Hücreler tekrar yıkanmış ve 10µl hücre alınarak steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Her tüpe içerisinde 0,5pmol/µl prob içeren hibridizasyon tamponundan 100'er µl eklenerek uygun sıcaklıkta 2-18 sa, karanlıkta inkübe edilmiştir (Manz vd., 1992).

**e- Yıkama:** Yıkama amacı ile örnekler steril tüplere aktarılmış, üzerlerine yıkama tamponu eklenmiş ve örnekler pipetaj yapılarak karıştırılıp uygun hibridizasyon sıcaklığında 30dk inkübe edilmiştir. Steril polikarbonat membran filtreler, steril filtre tutucuya yerleştirilerek örnekler filtrelerden geçirilmiştir. Filtreler, üzerlerinde 1 damla floresans koruyucu ortam bulunan lamlar üzerine koyulmuştur. Birer damla daha floresans koruyucu ortam damlatılarak lamlar havada ve karanlıkta kurumaya bırakılmıştır (Manz vd., 1992).

**f- Mikroskopik inceleme:** Çalışmamızda ADU Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan Olympus BX50 model floresans mikroskop ve bu mikroskoba ait iki adet floresans filtre ( U-MWU2 ve U-MWIB2) kullanılmıştır. Her bir örnek için 2 tekrarlı analiz yapılmıştır. Sayımlar, Breed yöntemi (Jay vd., 2005) ile yapılmıştır.



Şekil 3.1. FISH tekniğinde yıkama basamağı

### 3.2.4. FISH Yöntemi ile Gıda ve Su Örneklerinde *E.coli*, *S aureus*, *Salmonella* ve *Legionella* Aranması

Tez materyalleri, 3.2.3' de verilen FISH protokolüne göre analiz edilmiş ve Türk Gıda Kodeksi et ürünleri için mikrobiyolojik kriterler tebliğine (Çizelge 3.2.) göre incelenmiştir.

Çizelge 3.2. Et ürünleri için mikrobiyolojik kriterler (6.02.2009/sayı 27133/ tebliğ no: 2009/4, 2009/6) (<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2000-4.html>)

	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i> (kob/g)	5	1	$5 \times 10^1$	$1 \times 10^2$
<i>Escherichia coli</i> (kob/g)*	5	0	Bulunmamalı	
<i>E. coli</i> O157: H7(kob/g)	5	0	Bulunmamalı	
<i>Staphylococcus aureus</i> (kob/g)	5	1	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^3$
<i>Clostridium perfringens</i> (kob/g)	5	2	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$
<i>Salmonella</i> (kob)	5	0	25 g'da bulunmamalı	
<i>Listeria monocytogenes</i> (kob)	5	0	25 g'da bulunmamalı	
Maya, küf (kob/g)	5	2	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$

\* Isı uygulaması görmüş ürünlerde

n: deney numune sayısı

c: m ile M arasındaki sayıda mikroorganizma ihtiva eden kabul edilebilir en fazla deney numune sayısını

m: (n-c) sayıdaki deney numunesinin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

M: c sayıdaki deney numunesinin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

FISH yöntemi ile analiz edilen 100 gıda örneğinden elde edilen *E.coli* sayıları kültürel yöntemler sonucunda elde edilen sonuçlarla beraber Çizelge 4.4' de verilmiştir. Ayrıca, Şekil 4.17.' de Aydın İli halk pazarından alınan piliç butu (PB5) örneğinden izole edilen *E.coli*' nin ECO probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü verilmiştir.

Analiz edilen 100 gıda örneğinde elde edilen *S.aureus* sayıları kültürel yöntemler sonucunda elde edilen sonuçlarla beraber Çizelge 4.7' de verilmiştir. Ayrıca, Şekil 4.20.' de Aydın İli halk pazarından alınan piliç butu (PB6) örneğinden izole edilen

*S.aureus*' un Sau probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü verilmiştir.

FISH yöntemi ile analiz edilen 100 gıda örneğinde *Salmonella spp.* saptanan örnekler Çizelge 4.10.' da verilmiştir. Şekil 4.23.' de Aydın İli halk pazarından alınan piliç butu (PB1) örneğinden izole edilen *Salmonella*' nın Sal3 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü verilmiştir.

FISH yöntemi ile analiz edilen 100 su örneğinde *Legionella* saptanmamıştır. Bu nedenle *Legionella pneumophila*'nın saf kültürü eklenerek FISH analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda elde edilen fotoğraflar Şekil 4.4a, Şekil 4.4b; Şekil 4.14 ve Şekil 4.26' da verilmiştir.

### **3.2.5. Kültürel Mikrobiyolojik Yöntemler ile Gıda ve Su Örneklerinde *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella* ve *Legionella* Aranması**

Bu çalışmada iki tekrarlı yapılan kültürel mikrobiyolojik yöntemlerle, gıda örneklerinde *E.coli*, *S.aureus* ve *Salmonella spp.*, su örneklerinde ise *Legionella* ve *E.coli* analizleri yapılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar eşleştirilmiş t-testine göre karşılaştırılmıştır. Tez materyalleri kültürel mikrobiyolojik yöntemler ile FDA/BAM ve ISO standartlarına bağlı kalınarak analiz edilmiştir. Buna göre 25g örnek, 225ml 1XPBS içerisinde seyreltikten sonra uygun seyreltme serileri hazırlanmış ve kültürel mikrobiyolojik yöntemler uygulanmıştır. Sıvı örnekler için seyreltme uygulanmamıştır.

#### **3.2.5.1. *E.coli* aranması ve sayımı (TS 6063/ISO 7251)**

*E.coli* aranmasının yapıldığı analiz yönteminde, örnek hazırlanıp dilüsyonları yapıldıktan sonra, ardışık 5 dilüsyondan 3' er adet LST besiyerine 1' er ml ekim yapılmış ve tüpler 37°C' de 24sa (gerekirse 48sa) inkübasyona bırakılmıştır. Burada pozitif sonuç veren tüplerden, su banyosunda 44,5°C' de tutulan EC Broth besiyerlerine ekim yapılmış ve gaz oluşumu için yine 44,5°C' de 24sa (gerekirse 48sa) inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda gaz oluşumu görülen tüpler fekal koliform olarak değerlendirilmiştir. Testin devamında EC Broth besiyerinde pozitif sonuç veren tüplerden 44,5°C' deki Tripton Water (TW) besiyerine ekim yapılmış ve aynı derecede 48sa inkübasyona bırakıldıktan sonra indol testi yapılmıştır. Bu testin sonunda indol pozitif reaksiyon veren tüpler *E.coli*, negatif

reaksiyon verenler ise *E.coli* dışındaki diğer fekal koliformlar olarak değerlendirilmiştir.

Kültürel yöntemle elde edilen *E.coli* sayıları FISH yöntemi ile elde edilen sonuçlarla beraber Çizelge 4.4.' de verilmiştir. Ayrıca, Aydın İli halk pazarından alınan piliç butu (PB5) örneğinden izole edilen *E.coli*' nin EC brothda gaz oluşturması Şekil 4.18.' de, indol testi ile kanıtlanması sırasında ortaya çıkan indol halkasının görüntüsü ise Şekil 4.19.' da verilmiştir.

### **3.2.5.2. *S.aureus* aranması ve sayımı (BAM, 2001)**

Uygun şekilde seyreltilen örneklerden toplam 1ml alınarak 3 petri Baird Parker agara (0,3ml, 0,3ml, 0,4ml) ekilmiş ve petriler 45-48sa 35°C' de inkübe edilmiştir. 20-200 arasında koloni içeren ve şüpheli *S.aureus* kolonileri içeren petriler seçilerek sayım yapılmıştır. Şüpheli *S.aureus* kolonileri alınarak 0,2-0,3ml BHI brotha aktarılmıştır. BHI süspansiyonu 18-24sa 35°C' de inkübe edilmiştir. 0,5ml EDTA' lı koagülaz plazması, BHI kültürüne eklenerek karıştırılmış ve 35°C' de inkübe edilerek pıhtılaşma incelenmiştir. Pıhtılaşma pozitif olan koloniler *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır.

Kültürel yöntemle elde edilen *S.aureus* sayıları FISH yöntemi ile elde edilen sonuçlarla beraber Çizelge 4.7.' de verilmiştir. Ayrıca, Aydın İli halk pazarından alınan piliç butu (PB6) örneğinden izole edilen *S.aureus*' un BPA' da oluşturduğu kolonilerin görüntüsü Şekil 4.21.' de, pozitif koagülaz testi görüntüsü ise Şekil 4.22.' de verilmiştir.

### **3.2.5.3. *Salmonella spp.* aranması (ISO 6579:2002)**

Ön zenginleştirme: 25g örnek 225ml laktoz broth ile veya tamponlanmış peptonlu su ile seyreltilerek karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen kültür steril bir kapaklı şişeye (500ml) aktarılarak 18±2sa 37°C' de inkübe edilmiştir.

Seçici zenginleştirme: Karışımdan 0,1ml alınarak 10ml RV broth ortamına ve 1ml alınarak 10ml MKTTn brotha aktararak karıştırılmıştır. RV broth 42°C' de 24±2sa, MKTTn broth ise 43°C' de 24±2sa inkübe edilmiştir.

İnkübe edilmiş sıvı ortamlardan 10µl (3 öze dolusu) alınarak, BSA ve XLD agara ekim yapılarak 35°C’ de 24sa inkübe edilmiştir. Şüpheli koloniler serolojik (PoliA-I ve Vi antiserumları) testler ile analiz edilerek kanıtlanmıştır.

Kültürel yöntem ile *Salmonella spp.* saptanan örnekler Çizelge 4.10’ da, *Salmonella spp.* nin XLD agarda oluşturduğu kolonilerin görüntüsü Şekil 4.24.’ de ve şüpheli kolonilerin kanıtlanmasında kullanılan aglütinasyon reaksiyonu görüntüsü Şekil 4.25.’ de verilmiştir.

#### **3.2.5.4. Legionella aranması**

McDade vd., (1977)’ ye göre yapılan analizde, su örnekleri 10 000g’ de santrifujlenerek yoğunlaştırılmış ve presipitattan 100µl alınarak BCYE agara yayma ekimi yapılmıştır. 10 gün, 36±2°C’ de inkübe edilen petrilere üreyen tipik *Legionella* kolonileri incelenmiştir.

Kültürel yöntem ile analiz edilen 100 su örneğinde *Legionella* saptanmamıştır. Bu nedenle *L.pneumophila*’nın saf kültürü uygun besiyerinde geliştirilmiştir. *L.pneumophila* 5854 kültürünün BCYE agardaki görüntüsü Şekil 4.27.’ de verilmiştir.

#### **3.2.6. Şüpheli Kolonileri Kanıtlama Testleri**

##### **3.2.6.1. Serolojik testler**

Şüpheli *Salmonella* kolonilerinin kanıtlanması amacıyla kullanılmıştır. 1 damla *Salmonella* Poly A-I&Vi Antiserumu temiz bir lama damlatılmıştır. Üzerine şüpheli koloniden öze ile alınarak antiserum ile karıştırılmıştır. Lamlar 1dk boyunca ters düz edilerek karıştırılmış ve aglütinasyon yorumlanmıştır.

##### **3.2.6.2. Koagülaz testi**

Şüpheli *S.aureus* kolonilerinin kanıtlanması amacıyla kullanılmıştır. %0,15 EDTA ve %0,85 NaCl içeren liyofilize tavşan plazmasından 0,5ml alınmış, BHI kültürüne eklenerek karıştırılmış ve 35°C’ de inkübe edilerek 6sa boyunca pıhtılaşma incelenmiştir. Pıhtılaşma pozitif olan koloniler *Staphylococcus aureus* olarak tanılanmıştır.

### 3.2.6.3. İndol testi

*E.coli* kanıtlaması amacıyla kullanılmıştır. TW besiyerinde 37°C’ de 24sa inkübasyona bırakılmış mikroorganizmalar üzerine Kovaks ayıracından 0,5ml ilave edilip karıştırılmıştır. Tüplerin üst kısmında 1-2dk içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol oluşumu) sarımsı halka oluşumu ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.7. FISH ve Kültürel Yöntemlerin Karşılaştırılması

Bu çalışmada iki tekrarlı yapılan FISH ve kültürel mikrobiyolojik yöntemlerle, gıda örneklerinde *E.coli*, *S.aureus* sayımları yapılmış ve *Salmonella spp.* varlığı araştırılmıştır. Su örneklerinde ise *Legionella* ve *E.coli* varlığı araştırılmıştır. Sayımlar, floresans mikroskopta, 60X’ lik objektifte, fotoğrafları çekilen 10 mikroskop alanı esas alınarak mikrometrik oküler kullanılarak Breed yöntemi (Jay vd, 2005) ile yapılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar eşleştirilmiş t-testine göre karşılaştırılmıştır. Buna göre, kültürel yöntemler ve FISH yöntemi ile elde edilen sonuçların istatistiki karşılaştırmaları *E.coli* sayım sonuçları için Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6. da; *S.aureus* sayım sonuçları için Çizelge 4.8. ve Çizelge 4.9.’ da verilmiştir.

### 3.2.8. FISH Tekniğinin Veriminin Belirlenmesi

FITC işaretli problarla hibridizasyon sonunda Sau probu ile hibridize edilmiş 16 örnek ve ECO1167 probu ile hibridize edilmiş 10 örnek DAPI (1mg/ml) ile boyanarak uygulanan FISH tekniğinin verimi belirlenmiştir. DAPI genellikle çevre, gıda ve klinik mikrobiyolojide mikroorganizma sayımı amacıyla kullanılan, nükleik asitleri boyama yeteneğine sahip türe veya genusa özgü olmayan evrensel bir floresans boyadır. DAPI ile boyanmış hücreler 365nm dalga boyunda ışık altında parlak mavi renkte gözlenirler.

DAPI ile boyama prosedürü Kobabe vd. (2004)’ ne göre yapılmıştır. Bu yönteme göre hibridize edilen örneklerin üzerine 2µl DAPI eklenmiş ve 15dk inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile 3 kez 20’ şer dk yıkanarak örnekler polikarbonat membran filtrelerden geçirilmiştir. Filtreler alınmış ve üzerlerinde 1 damla floresans koruyucu ortam bulunan lamlar üzerine koyulmuştur. Üzerlerine birer damla daha floresans koruyucu ortam damlatılarak lamlar havada ve

karanlıkta kurumaya bırakıldıktan sonra mikroskopta incelenerek sayım yapılmıştır.

Örnekler FISH ve boyama işlemlerinden sonra epifloresan mikroskopta incelenirken, U-MWU2 (330-385nm/420nm)ve U-MVIB2 (460-490nm/510nm) olmak üzere iki farklı filtre kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler önce U-MWIB2 filtresi ile görüntülendikten, hücreler netleştirildikten ve fotoğraflandıktan sonra U-MWU2 filtresi ile incelemeye geçilmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 4.28., Şekil 4.29.). Elde edilen sayım sonuçları, (FITC ile boyanan hücre sayısı / DAPI ile boyanan hücre sayısı) x 100 formülünde yerine koyularak FISH verimi (%) hesaplanmıştır. ECO1167 probu ile incelenen örneklerin hibridizasyon verimleri Çizelge 4.11.' de; Sau probu ile incelenen örneklerin hibridizasyon verimleri ise Çizelge 4.12.' de verilmiştir.

### **3.2.9. FISH Tekniğinin Uygulanma Süresinin Kısaltılması**

FISH tekniğinde gerekli zamanın azaltılması amacıyla her bir basamak yeniden değerlendirmeye alınmıştır. Bu amaçla ECO1167 probu kullanılarak *E.coli* hücreleri ile çalışılmıştır. Çalışmamızın başından itibaren fiksasyon basamağı en az 3sa olarak uygulanmıştır. Çalışmanın bu kısmında, fiksasyon basamağı için 15 dakikadan 1 saate kadar değişen süreler denenerek, 18sa hibridizasyon uygulanmış, hücreler DAPI ile boyanmış ve FISH verimi (%) hesaplanmıştır.

Çalışmanın bu kısmında hibridizasyon süresinin kısaltılmasına yönelik araştırmalar da yapılmıştır. Bu çalışmalarda, PFA muamelesi 1sa olarak uygulanmış ve hibridizasyon için 30dk ile 3sa arasında değişen süreler denenmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Floresans İşaretli Probların Hibridizasyon Sıcaklıkları

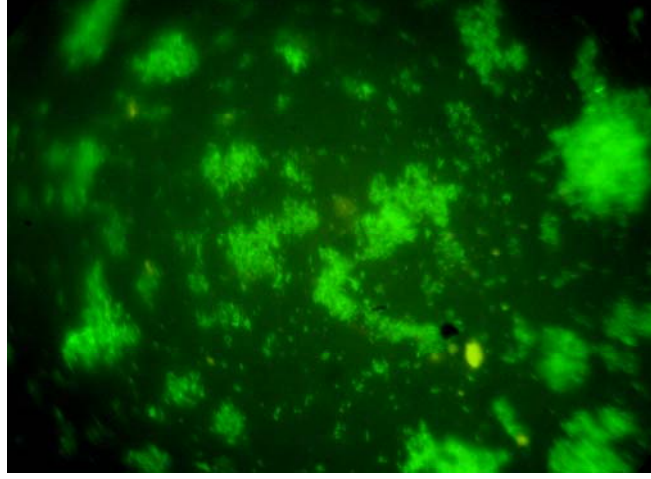
Denenen 12 farklı hibridizasyon sıcaklığında (25°C, 27°C, 30°C, 35 °C, 37 °C, 39 °C, 40°C, 41 °C, 43 °C, 45 °C, 47 °C, 50 °C) yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda floresans sinyalin şiddetine göre görsel bir ayırım yapılarak problemlerin hibridizasyon sıcaklıkları Çizelge 4.1.' deki gibi belirlenmiştir. Denenen diğer sıcaklıklar floresans sinyalin çok fazla olmasıyla bakteri hücreleri ayırt edilemediğinden çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmamıştır.

Çizelge 4.1. Problemlerin hibridizasyon sıcaklıkları

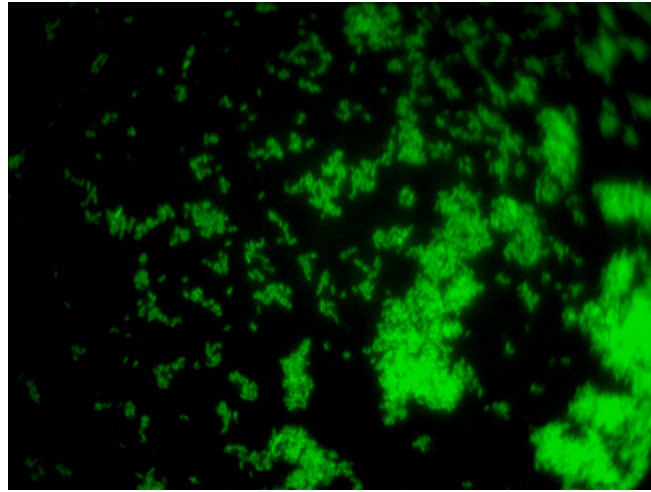
Prob	T <sub>m</sub> (°C)	Denenen hibridizasyon sıcaklıkları								Seçilen Hibridizasyon sıcaklığı (°C)
EUB338	64.4	35	37	39	41	43	45	47	50	43
NonEUB338	64.4	35	37	39	41	43	45	47	50	43
ECO1167	70.3	35	37	39	41	43	45	47	50	47
Sau	65.1	35	37	39	41	43	45	47	50	43
Sal3	53.0	25	27	30	35	37	40	43	45	37
Leg705	60.7	35	37	39	41	43	45	47	50	45

Problemlerin maksimum ve minimum floresans sinyal gösterdikleri hibridizasyon sıcaklıkları sonunda elde edilen fotoğraflar Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.' de verilmiştir.

EUB338 ve Sau problemlerinin floresans sinyal oluşturması 43°C’ de maksimuma ulaşmıştır. Şekil 4.1.’ de EUB338 ile hibridize edilen *S.aureus* ATCC 25923 kiltürlerinin a)35°C’ de hibridizasyon sonucu b)43°C’ de hibridizasyonu sonucu floresans görüntüleri verilmiştir.

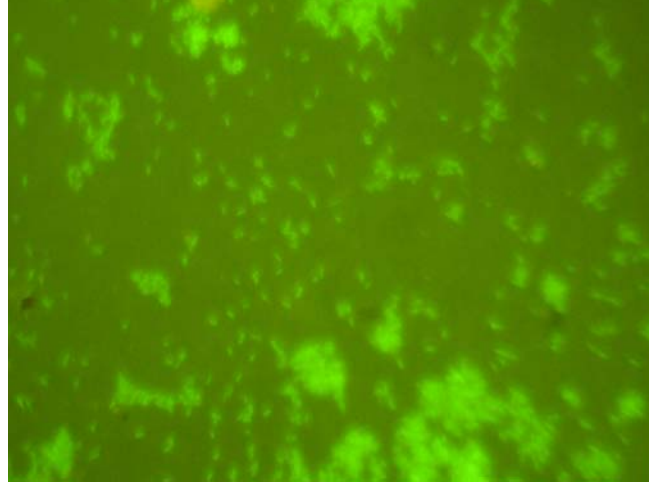


Şekil 4.1a. EUB338 ile hibridize edilen *S.aureus* ATCC 25923 kiltürünün 35°C’ de hibridizasyon sonucu oluşan floresans görüntüsü

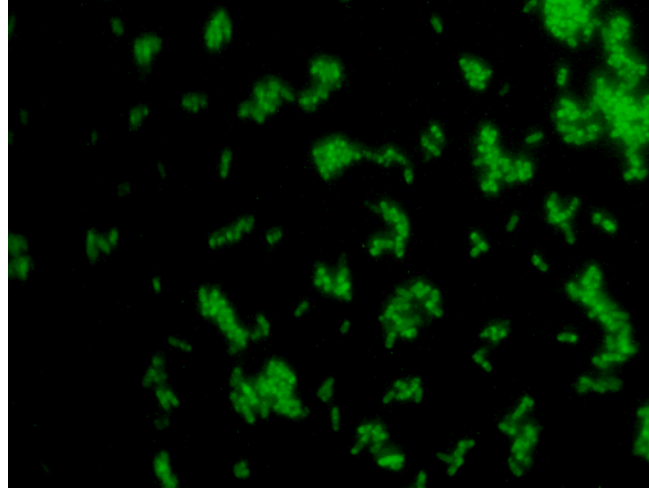


Şekil 4.1b. EUB338 ile hibridize edilen *S.aureus* ATCC 25923 kiltürünün 43°C’ de hibridizasyonu sonucu oluşan floresans görüntüsü

ECO1167 probunun floresans sinyal oluşturması 47°C' de maksimuma ulaşmıştır. Şekil 4.2.' de ECO1167 ile hibridize edilen *E.coli* ATCC 35218 kültürlerinin a)35°C' de hibridizasyon sonucu b)47°C' de hibridizasyonu sonucu floresans görüntüleri verilmiştir.

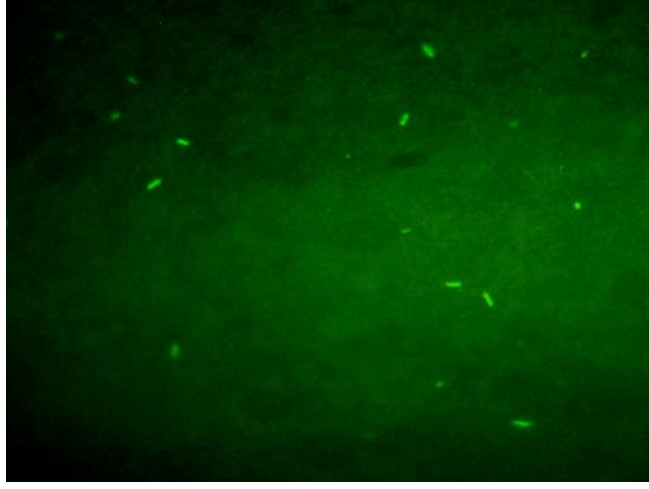


Şekil 4.2a. ECO1167 ile hibridize edilen *E.coli* ATCC 35218kltrnn 35°C' de hibridizasyon sonucu oluşan floresans görüntüsü

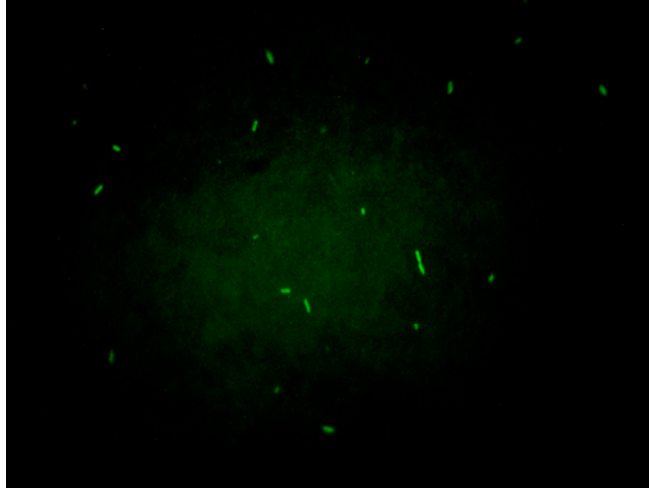


Şekil 4.2b. ECO1167 ile hibridize edilen *E.coli* ATCC 35218 kültürünün 47°C' de hibridizasyon sonucu oluşan floresans görüntüsü

Sal3 probunun floresans sinyali 37°C’ de maksimuma ulaşmıştır. Şekil 4.3.’ de Sal3 ile hibridize edilen *S.typhimirium* ATCC 14028 kültürlerinin a)25°C’ de hibridizasyon sonucu b)37°C’ de hibridizasyonu sonucu floresans görüntüleri verilmiştir.

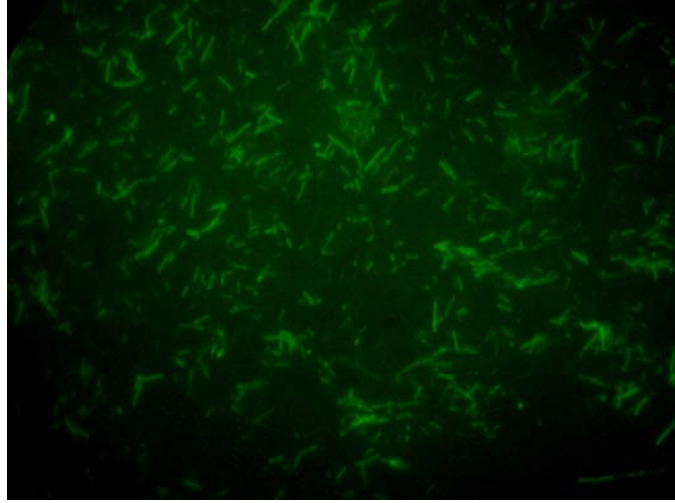


Şekil 4.3a. Sal3 ile hibridize edilen *S.typhimirium* ATCC 14028 kültürünün 25°C’ de hibridizasyon sonucu oluşan floresans görüntüsü

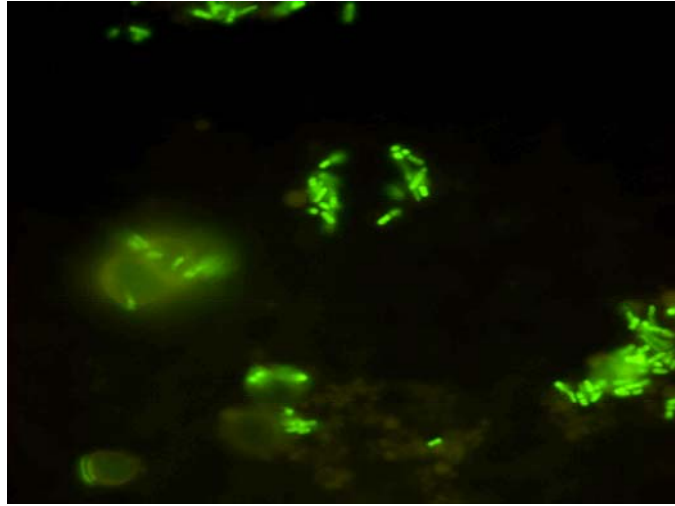


Şekil 4.3b. Sal3 ile hibridize edilen *S.typhimirium* ATCC 14028 kültürünün 37°C’ de hibridizasyonu sonucu oluşan floresans görüntüsü

LEG705 probunun floresans sinyal oluşturması 45°C’ de maksimuma ulaşmıştır. Şekil 4.4.’ de LEG705 ile hibridize edilen *L.pneumophila* 5854 kültürlerinin a)35°C’ de hibridizasyon sonucu b)45°C’ de hibridizasyonu sonucu floresans görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.4a. LEG705 ile hibridize edilen *L.pneumophila* 5854 kültürünün 35°C’ de hibridizasyon sonucu oluşan floresans görüntüsü



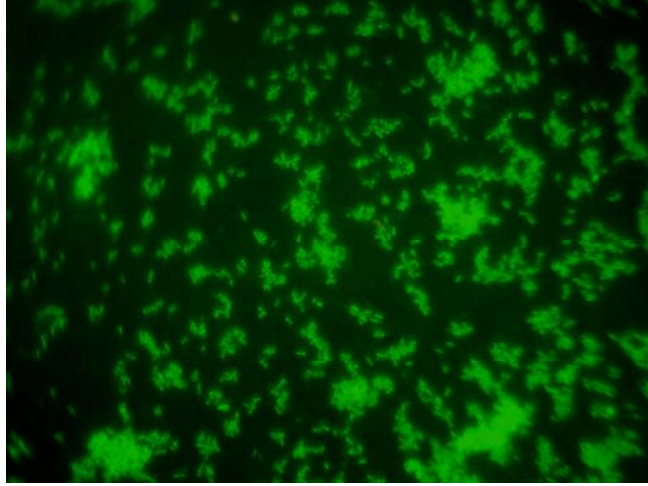
Şekil 4.4b. LEG705 ile hibridize edilen *L.pneumophila* 5854 kültürünün 45°C’ de hibridizasyon sonucu oluşan floresans görüntüsü

## 4.2. Problemlerin Özgüllüklerinin Araştırılması

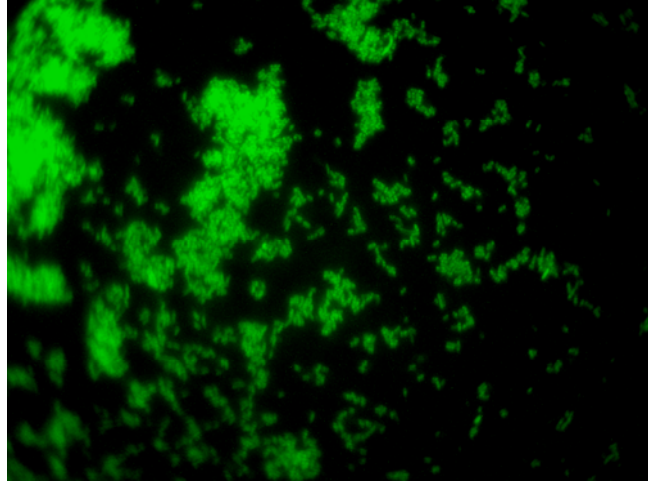
Çalışmamızda kullandığımız problemlerin dizayn edildikleri türe olan özgüllüklerinin incelenmesi için her bir prob için karışık bakteri kültürleri hazırlanmıştır. Türe özgü problemlerin karışık kültür içerisinde ilgili bakteri türünü seçip seçemedikleri, oluşturdukları floresans sinyal incelenerek araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan bakteri kültürleri ve karışımları Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Bu kültürlerle yapılan hibridizasyon sonucunda epifloresans mikroskopta elde edilen fotoğraflar (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.) verilmiştir.

Çizelge 4.2. Problemlerin özgüllüklerinin araştırılması için hazırlanan bakteri kültürleri ve karışımları

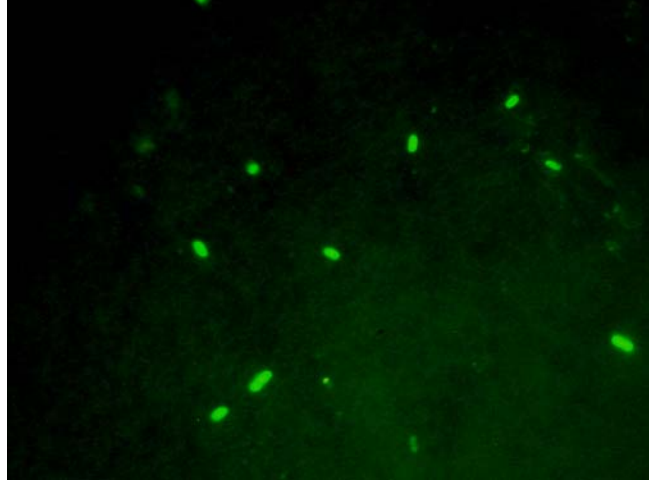
Sau	ECO1167	Sal3
<i>S.aureus</i> ATCC 25923 <i>M.luteus</i> ATCC 9341 <i>E.coli</i> ATCC 35218	<i>E.coli</i> ATCC 35218 <i>M.luteus</i> ATCC 9341 <i>B.mycooides</i> ATCC 10206	<i>S.typhimirium</i> ATCC 14028 <i>E.coli</i> ATCC 35218 <i>S.aureus</i> ATCC 25923
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 35218	<i>S.typhimirium</i> ATCC 14028
EUB338		NonEUB338
<i>E.coli</i> ATCC 35218 <i>B.mycooides</i> ATCC 10206 <i>M.luteus</i> ATCC 9341	<i>E.coli</i> ATCC 35218 <i>B.mycooides</i> ATCC 10206 <i>M.luteus</i> ATCC 9341	
<i>B.mycooides</i> ATCC 10206	<i>B.mycooides</i> ATCC 10206	
<i>M.luteus</i> ATCC 9341	<i>M.luteus</i> ATCC 9341	
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	
<i>E.coli</i> ATCC 35218	<i>E.coli</i> ATCC 35218	



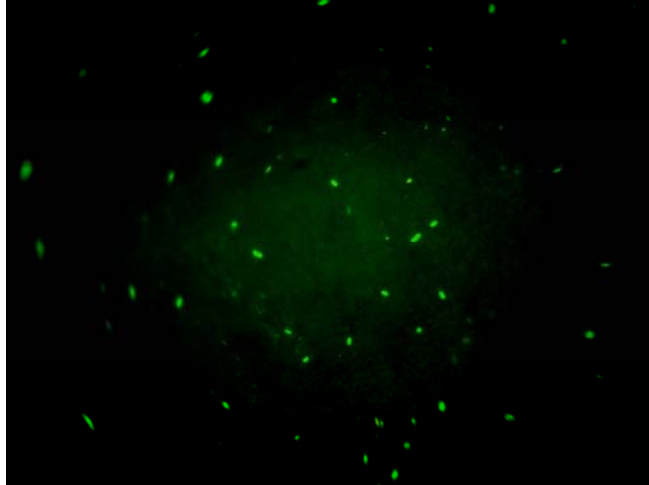
Şekil 4.5. *S.aureus* ATCC 25923 kültürünün Sau probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (60X)



Şekil 4.6. *S.aureus* ATCC 25923, *M.luteus* ATCC 9341 ve *E.coli* ATCC 35218 bakteri karışımının Sau probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (40X)

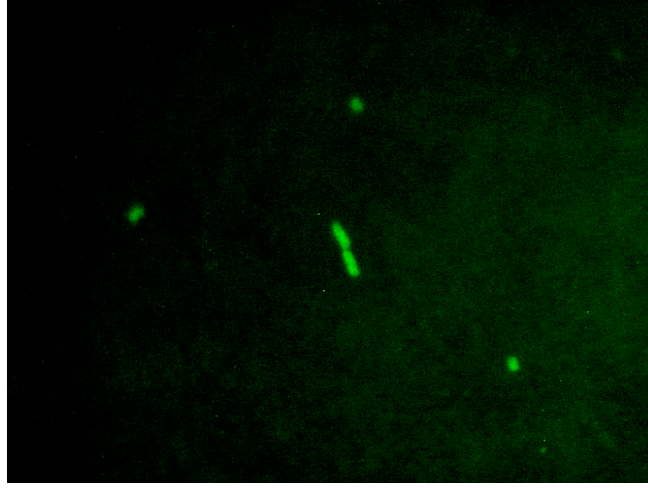


Şekil 4.7. *E.coli* ATCC 35218 bakteri kültürünün ECO1167 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (100X)

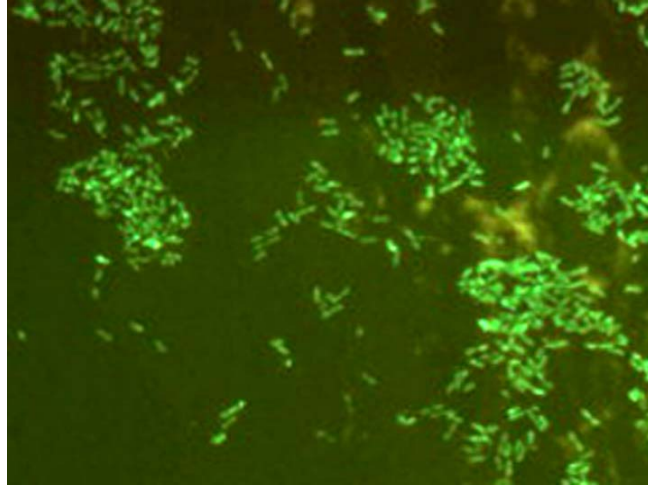


Şekil 4.8. *E.coli* ATCC 35218, *M.luteus* ATCC 9341, *B.mycoides* ATCC 10206 bakteri kültürü karışımının ECO1167 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (60X)

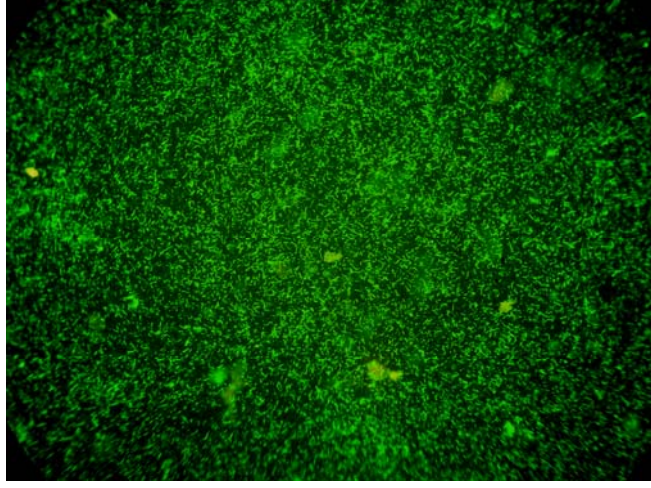




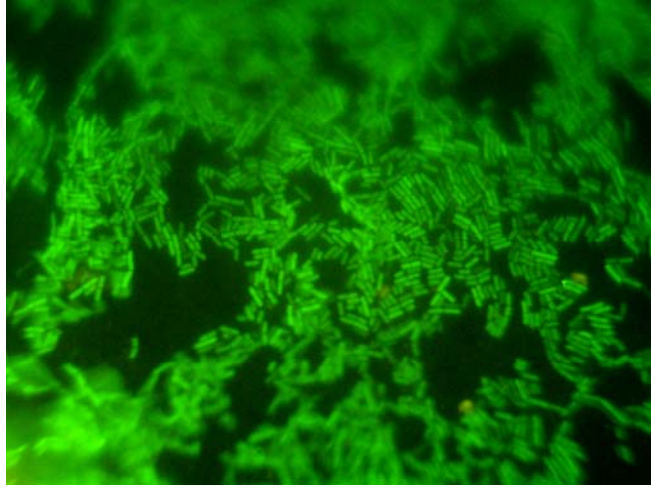
Şekil 4.9. *S.typhimirium* ATCC 14028 bakteri kültürünün Sal3 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (100X)



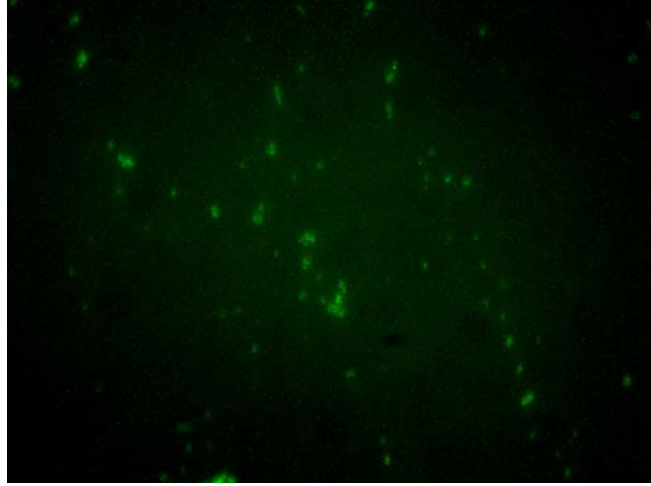
Şekil 4.10. *S.typhimirium* ATCC 14028, *E.coli* ATCC 35218, *S.aureus* ATCC 25923 bakteri kültürü karışımının Sal3 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (60X)



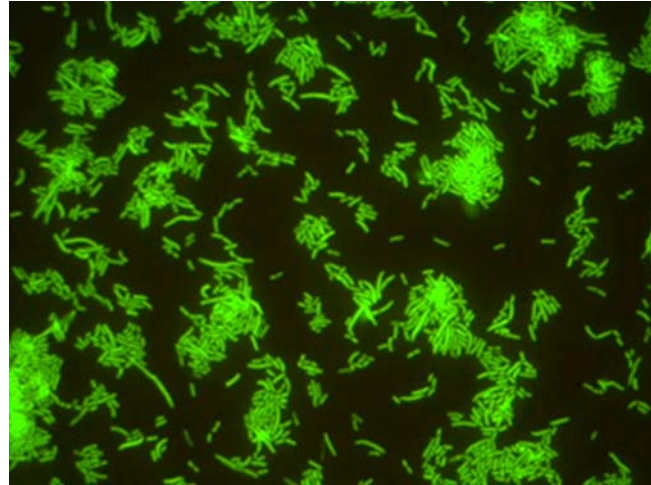
Şekil 4.11. *E.coli* ATCC 35218, *B.mycoides* ATCC 10206, *M.luteus* ATCC 9341 bakteri kültürü karışımının EUB338 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (40X)



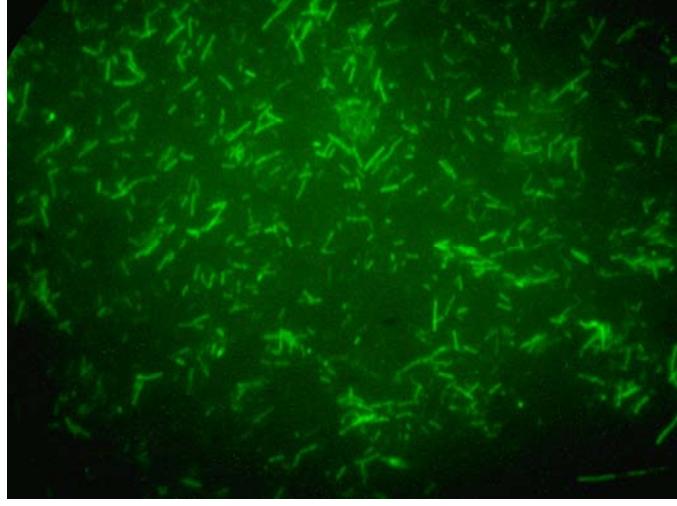
Şekil 4.12. *B.mycoides* ATCC 10206 bakteri kültürünün EUB338 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (100X)



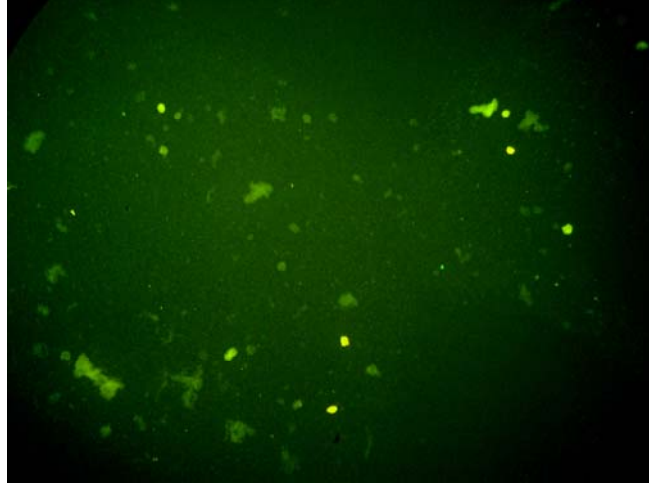
Şekil 4.13. *M.luteus* ATCC 9341 bakteri kültürünün EUB338 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoftaki görüntüsü (100X)



Şekil 4.14. *L.pneumophila* 5854 suşunun Leg705 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoftaki görüntüsü (60X)



Şekil 4.15. *L.pneumophila* 5854, *B.mycoides* ATCC 10206 ve *E.coli* ATCC 35218 bakteri kültürü karışımının EUB338 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (40X)



Şekil 4.16. *E.coli* ATCC 35218, *M. luteus* ATCC 49732, *B. mycoides* ATCC 10206 bakteri kültürü karışımının NonEUB338 probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (60X)

### 4.3. Hazırlanmış Bakteri Kùltürlerinin Floresans İşaretli Problar ile Sayımı

Çalışmamızda kullandığımız probların dizayn edildikleri türe olan özgülüklerinin incelenmesi için  $10^7$ - $10^8$ kob/ml bakteri içeren, *S.typhimirium* ATCC 14028, *S.aureus* ATCC 25923 ve *B.mycooides* ATCC 10206 kùltürleri hazırlanmıştır. Bakteri sayımı ile probların özgülüklerin araştırılması amacıyla hazırlanan süspansiyonların içerdiği hücre sayıları ve FISH ve kùltürel yöntemler ile elde edilen ortalama sayım sonuçları Çizelge 4.3.' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Bilinen sayıda bakteri hücresi içeren kùltür ile FISH ve kùltürel yöntemlerin karşılaştırılması

Prob	Bakteri	Sayım sonuçları		Sayımlar arasındaki fark
		FISH (hücre/ml)	Kùltürel yöntem (kob/ml)	
EUB338	<i>B.mycooides</i> ATCC 10206	$8,2 \times 10^7$	$7,6 \times 10^8$	1 log
NonEUB338	<i>B.mycooides</i> ATCC 10206	<100000	<100000	0
LEG705	<i>L.pneumophila</i> 5854	$3,8 \times 10^8$	$2,7 \times 10^7$	1 log
Sal3	<i>S.typhimirium</i> ATCC 14028	$2,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$	1 log
Sau	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	$3,9 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	0

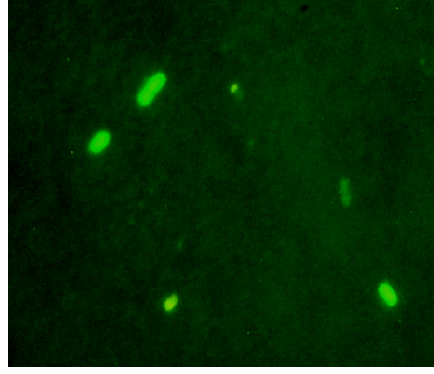
### 4.4. FISH ve Kùltürel Yöntemlerle Elde Edilen Sayım Sonuçları

Bu bölümde, tez materyallerindeki *E.coli* ve *S. aureus* sayım sonuçları, floresans mikroskop fotoğrafları, *Salmonella spp.* saptanan tez materyalleri ve *L.pneumophila*'nın saf kùltürü ile yapılan FISH analizleri sonucunda elde edilen fotoğraflar, ayrıca FISH ve kùltürel yöntemlerle elde edilen sayım sonuçlarının istatistiki değerlendirme sonuçları verilmiştir.

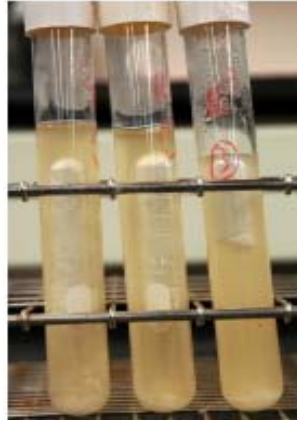
#### 4.4.1. Gıda Örneklerindeki *E.coli* Sayım Sonuçları

*E.coli* sayım sonuçları Çizelge 4.4.' de verilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri için Mikrobiyolojik Kriterler tebliğine (Çizelge 3.5.) göre et ve et ürünlerinde

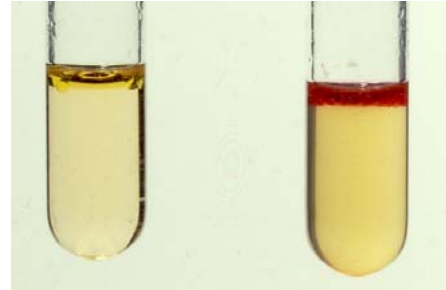
bulunabilecek sınıır *E.coli* sayısı  $1 \times 10^2$  kob/g dır. Çalışmamızda 100 et örneğinin 84 tanesinde sınıır değerin üzerinde (Çizelge 4.4.' de, sınıır değerin üzerinde *E.coli* içeren örnekler '\*' işareti ile gösterilmiştir.) *E.coli* hücrelerine rastlanmıştır. Gıda örneğlerinden (PB5) izole edilen bir *E.coli* suşunun EC brothda gaz oluşturması Şekil 4.17' de ve *E.coli* kanıtlama testlerinden olan İndol testi sonucunda oluşan indol halkası Şekil 4.18.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. PB5 örneğindeki *E.coli*' nin ECO probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki (100X) görüntüsü



Şekil 4.18. PB5 örneğindeki *E.coli*' nin EC brothda oluşturduğu gaz kabarcıkları



Şekil 4.19. PB5 örneğindeki *E.coli*' nin indol testi sonucunda oluşturduğu indol halkası

Çizelge 4.4. Gıda örneklerinde, FISH ve kültürel yöntemlerle elde edilen *E.coli* sayıları

Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)		Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)	
	1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar		1.tekrar	2. tekrar	1.tekrar	2. tekrar
<b>PB2*</b>	3,4x10 <sup>2</sup>	4,3x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>	4,3x10 <sup>2</sup>	<b>PP3*</b>	6,3x10 <sup>2</sup>	5,9x10 <sup>2</sup>	5,9x10 <sup>2</sup>	7,1x10 <sup>2</sup>
<b>PB3*</b>	3,5x10 <sup>2</sup>	5,4x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	<b>PP4*</b>	4,8x10 <sup>2</sup>	6,2x10 <sup>2</sup>	6,1x10 <sup>2</sup>	6,9x10 <sup>2</sup>
<b>PB4*</b>	5,7x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	6,7x10 <sup>3</sup>	5,9 10 <sup>3</sup>	<b>PP5*</b>	7,0x10 <sup>2</sup>	7,4x10 <sup>2</sup>	7,1x10 <sup>2</sup>	7,9x10 <sup>2</sup>
<b>PB5*</b>	7,8x10 <sup>2</sup>	5,9x10 <sup>2</sup>	2,3x10 <sup>2</sup>	3,4x10 <sup>2</sup>	<b>PP6*</b>	7,9x10 <sup>3</sup>	8,1x10 <sup>3</sup>	7,6x10 <sup>3</sup>	8,2x10 <sup>3</sup>
<b>PB6*</b>	8,0x10 <sup>2</sup>	7,8x10 <sup>2</sup>	7,0x10 <sup>2</sup>	7,6x 10 <sup>2</sup>	<b>PP7*</b>	7,7x10 <sup>3</sup>	7,6x10 <sup>3</sup>	6,3x10 <sup>3</sup>	7,3x10 <sup>3</sup>
<b>PB7*</b>	8,8x10 <sup>2</sup>	9,4x10 <sup>2</sup>	2,3x10 <sup>2</sup>	2,8x10 <sup>2</sup>	<b>TC2*</b>	6,3x10 <sup>2</sup>	7,0x10 <sup>2</sup>	6,1x10 <sup>2</sup>	6,4x10 <sup>2</sup>
<b>PB8*</b>	4,5x10 <sup>2</sup>	3,9x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	7,8x10 <sup>2</sup>	<b>TC3*</b>	4,4x10 <sup>2</sup>	4,1x10 <sup>2</sup>	4,3x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>
<b>PB9*</b>	3,0x10 <sup>3</sup>	3,5x10 <sup>3</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>	4,5x10 <sup>3</sup>	<b>TC4*</b>	3,6x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	5,1x10 <sup>2</sup>	5,3x10 <sup>2</sup>
<b>PB10*</b>	7,5x10 <sup>3</sup>	7,6x10 <sup>3</sup>	9,5x 10 <sup>3</sup>	9,8x 10 <sup>3</sup>	<b>TC5*</b>	3,9x10 <sup>2</sup>	3,9x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>	4,8x10 <sup>2</sup>
<b>PB11*</b>	8,3x10 <sup>2</sup>	6,7x10 <sup>2</sup>	8,9x10 <sup>2</sup>	9,6x10 <sup>2</sup>	<b>TC6*</b>	8,4x10 <sup>3</sup>	8,1x10 <sup>3</sup>	8,3x 10 <sup>3</sup>	9,1x10 <sup>3</sup>
<b>PB12*</b>	8,4x10 <sup>2</sup>	7,6x10 <sup>2</sup>	7,4x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	<b>TC7*</b>	5,3x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>	4,8x10 <sup>2</sup>	5,4x10 <sup>2</sup>
<b>PB13*</b>	7,9x10 <sup>3</sup>	6,8x10 <sup>3</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>	4,6x10 <sup>3</sup>	<b>TC8*</b>	7,7x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>	7,6x10 <sup>2</sup>	4,8x10 <sup>2</sup>

Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)		Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)	
	1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar		1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar
<b>PB14*</b>	6,3x10 <sup>2</sup>	5,9x10 <sup>2</sup>	5,9x10 <sup>2</sup>	7,1x10 <sup>2</sup>	<b>TC9*</b>	10,4x10 <sup>4</sup>	8,4x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>	8,9x10 <sup>4</sup>
<b>PB15*</b>	6,8x10 <sup>2</sup>	6,2x10 <sup>2</sup>	6,1x10 <sup>3</sup>	6,9x10 <sup>3</sup>	<b>TC10*</b>	5,0x10 <sup>5</sup>	5,9x10 <sup>5</sup>	6,9x10 <sup>4</sup>	7,8x10 <sup>4</sup>
<b>PB16*</b>	6,4x10 <sup>2</sup>	4,7x10 <sup>2</sup>	7,1x10 <sup>2</sup>	7,9x10 <sup>2</sup>	<b>TC11*</b>	5,4x10 <sup>5</sup>	4,9x10 <sup>5</sup>	8,9x10 <sup>4</sup>	9,1x10 <sup>4</sup>
<b>BPP2</b>	6,0x10 <sup>1</sup>	10,4x10 <sup>1</sup>	7,5x10 <sup>1</sup>	6,0x10 <sup>1</sup>	<b>TPK3*</b>	6,3x10 <sup>4</sup>	11,4x10 <sup>4</sup>	8,4x10 <sup>4</sup>	6,9x10 <sup>4</sup>
<b>BPP3</b>	2,3x10 <sup>1</sup>	11,4x10 <sup>1</sup>	8,8 x10 <sup>1</sup>	2,4x10 <sup>1</sup>	<b>TPK1*</b>	5,0x10 <sup>4</sup>	11,4x10 <sup>4</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>	7,8x10 <sup>4</sup>
<b>TPK2*</b>	6,4x10 <sup>4</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>3</sup>	3,9x10 <sup>3</sup>	<b>DK4*</b>	7,0x10 <sup>3</sup>	8,2x10 <sup>3</sup>	4,7x10 <sup>3</sup>	8,9x10 <sup>3</sup>
<b>TPK3*</b>	10,4x10 <sup>4</sup>	9,3x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>3</sup>	2,9x10 <sup>3</sup>	<b>DK5*</b>	6,2 x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	3,5x10 <sup>3</sup>	3,3x10 <sup>3</sup>
<b>TPK4*</b>	6,9x10 <sup>4</sup>	6,2 x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>	<b>DK6*</b>	6,2 x10 <sup>4</sup>	6,6x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>
<b>TPK5*</b>	5,4x10 <sup>4</sup>	4,3 x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	<b>DK7*</b>	3,7x10 <sup>4</sup>	3,5x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>
<b>TPK6*</b>	5,4x10 <sup>5</sup>	5,6x10 <sup>5</sup>	7,2x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>	<b>DK8*</b>	1,3x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>
<b>TPK7*</b>	4,9x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>	8,7x10 <sup>4</sup>	9,4x10 <sup>4</sup>	<b>DK9</b>	3,6x10 <sup>1</sup>	4,1x10 <sup>1</sup>	2,6x10 <sup>1</sup>	3,6x10 <sup>1</sup>
<b>TPK8*</b>	7,0x10 <sup>4</sup>	8,2x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	8,9x10 <sup>4</sup>	<b>DK10</b>	5,4x10 <sup>1</sup>	5,0x10 <sup>1</sup>	5,8x10 <sup>1</sup>	4,8x10 <sup>1</sup>
<b>TPK9*</b>	6,9 x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	<b>DK11</b>	2,3x10 <sup>1</sup>	2,6x10 <sup>1</sup>	1,9x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>
<b>TPK10*</b>	9,2 x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	<b>DK12</b>	5,0x 10 <sup>1</sup>	6,3x10 <sup>1</sup>	4,6 x10 <sup>1</sup>	4,6 x10 <sup>1</sup>
<b>TPK11*</b>	3,7x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>4</sup>	<b>DK13*</b>	2,4x10 <sup>3</sup>	4,6x10 <sup>3</sup>	2,0 x10 <sup>3</sup>	1,8 x10 <sup>3</sup>



Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)		Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)	
	1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar		1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar
<b>TPK12*</b>	1,2x10 <sup>4</sup>	1,9x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	<b>DK14*</b>	1,8x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	1,6 x10 <sup>3</sup>	1,7 x10 <sup>3</sup>
<b>TPK13</b>	2,6x10 <sup>1</sup>	4,1 x10 <sup>1</sup>	2,4 x10 <sup>1</sup>	3,6 x10 <sup>1</sup>	<b>DK15*</b>	5,0x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	4,6 x10 <sup>2</sup>	7,2 x10 <sup>2</sup>
<b>BPP4</b>	5,2x 10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	6,3 x10 <sup>1</sup>	4,8 x10 <sup>1</sup>	<b>DK16*</b>	6,6x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	7,0 x10 <sup>4</sup>	5,8 x10 <sup>4</sup>
<b>BPP5</b>	2,7x10 <sup>1</sup>	2,6x10 <sup>1</sup>	1,8 x10 <sup>1</sup>	2,1 x10 <sup>1</sup>	<b>DK17*</b>	7,4x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>
<b>PP1</b>	5,0x 10 <sup>1</sup>	6,1x10 <sup>1</sup>	4,5 x10 <sup>1</sup>	4,6 x10 <sup>1</sup>	<b>DK18*</b>	9,3x10 <sup>4</sup>	7,2x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>
<b>PP2*</b>	2,3x10 <sup>3</sup>	4,5x10 <sup>3</sup>	2,1 x10 <sup>3</sup>	1,8 x10 <sup>3</sup>	<b>DK19*</b>	7,9 x10 <sup>4</sup>	8,7x10 <sup>4</sup>	9,4x10 <sup>4</sup>	8,4x10 <sup>4</sup>
<b>DK1*</b>	1,7x10 <sup>3</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	1,6 x10 <sup>3</sup>	1,7 x10 <sup>3</sup>	<b>DK20*</b>	4,3 x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	8,9x10 <sup>4</sup>	8,9x10 <sup>4</sup>
<b>DK2*</b>	5,0x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	4,6 x10 <sup>2</sup>	7,2 x10 <sup>2</sup>	<b>DK21*</b>	5,6x10 <sup>3</sup>	4,5x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>
<b>DK3*</b>	6,9x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	7,1 x10 <sup>4</sup>	5,8 x10 <sup>4</sup>	<b>DK22*</b>	3,8x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>
<b>DK23*</b>	7,0x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	3,5x10 <sup>4</sup>	<b>DK37*</b>	6,1x 10 <sup>2</sup>	12,9 x 10 <sup>2</sup>	6,9x 10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>
<b>DK24*</b>	6,9 x10 <sup>4</sup>	1,9x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	<b>DK38*</b>	1,5x 10 <sup>2</sup>	7,4 x 10 <sup>2</sup>	8,4x 10 <sup>2</sup>	7,2 x10 <sup>2</sup>
<b>DK25*</b>	9,2 x10 <sup>4</sup>	4,1 x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	<b>DK39*</b>	5,3x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	5,3 x10 <sup>4</sup>	2,8 x10 <sup>4</sup>
<b>DK26</b>	3,7x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>	2,4 x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>	<b>DK40*</b>	7,2x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	4,1 x10 <sup>4</sup>
<b>DK27*</b>	2,2x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	2,0 x10 <sup>4</sup>	<b>DK41*</b>	8,7x10 <sup>4</sup>	9,4x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	6,3x10 <sup>4</sup>
<b>DK28*</b>	1,3x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	1,6 x10 <sup>3</sup>	<b>DK42*</b>	4,7x10 <sup>4</sup>	8,9x10 <sup>4</sup>	6,8x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>

Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)		Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)	
	1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar		1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar
<b>DK29</b>	3,6x10 <sup>1</sup>	4,1x10 <sup>1</sup>	3,6x10 <sup>1</sup>	4,6 x10 <sup>1</sup>	<b>DK43*</b>	2,5x10 <sup>3</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>
<b>DK30</b>	5,4x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	4,8x10 <sup>1</sup>	7,0 x10 <sup>1</sup>	<b>DK44</b>	7,4x10 <sup>1</sup>	4,1 x10 <sup>1</sup>	4,6 x10 <sup>1</sup>	5,6x10 <sup>1</sup>
<b>DK31</b>	2,3x10 <sup>1</sup>	2,6x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	1,8 x10 <sup>1</sup>	<b>DK45*</b>	9,3x10 <sup>4</sup>	8,2x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>
<b>DK32</b>	5,0x 10 <sup>1</sup>	6,3x10 <sup>1</sup>	4,6 x10 <sup>1</sup>	1,7 x10 <sup>1</sup>	<b>DK46*</b>	6,2 x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	1,6 x10 <sup>3</sup>
<b>DK33*</b>	2,4x10 <sup>3</sup>	4,6x10 <sup>3</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	<b>DK47*</b>	4,3 x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	4,6 x10 <sup>4</sup>
<b>DK34*</b>	1,8x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	<b>DK48*</b>	5,6x10 <sup>3</sup>	3,2x10 <sup>3</sup>	4,2x10 <sup>3</sup>	7,0 x10 <sup>3</sup>
<b>DK35*</b>	5,0x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	9,4x10 <sup>2</sup>	7,2 x10 <sup>2</sup>	<b>DK49*</b>	4,3x10 <sup>3</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	2,2x10 <sup>3</sup>	1,8 x10 <sup>3</sup>
<b>DK36*</b>	6,6x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	8,9x10 <sup>4</sup>	5,8 x10 <sup>4</sup>	<b>DK50*</b>	4,9 x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>

\* Sınır değerinin üzerinde *E.coli* içeren örnekler

#### 4.4.1.1. *E. coli* sayım ortalamalarının istatistikî verileri

Bu çalışmada analiz edilen 100 gıda örneğinden FISH ve kültürel yöntem ile elde edilen *E.coli* sayım ortalamaları eşleştirilmiş t-testi ile analiz edilmiş ve yöntemlerin sayım sonuçlarında farklılık yaratıp yaratmadığı değerlendirilmiştir. Çizelge 4.5.' de *E.coli* sayımlarına ait tanımlayıcı istatistikler, Çizelge 4.6.' da ise *E.coli* sayımlarının eşleştirilmiş t-testi sonuçları verilmiştir. Buna göre, tavuk ve dana eti örnekleri üzerinde denenen iki yöntemden FISH yöntemi, kültürel yöntemle göre sayım ortalamalarında istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Bu farklar FISH yöntemi lehinedir (Tavuk materyali için FISH-Kültür:  $t=2,471$ ;  $df: 49$ ;  $P<0.05$ ; Dana materyali için FISH-Kültür:  $t=3,114$ ;  $df:49$ ;  $P<0.01$ ). Tavuk ve dana eti örneklerini birlikte değerlendirdiğimizde FISH yönteminin daha başarılı olduğu görülmektedir (Tavuk ve dana materyalleri için FISH-Kültür:  $t= 2,838$ ;  $df: 99$ ;  $P<0.01$ ).

Çizelge 4.5. *E. coli* sayımlarına ait tanımlayıcı istatistikler

Materyal	Yöntem	Ortalama	N*	SD*	SE*
Tavuk eti	FISH-TAVUK	58693,74	50	138891,07	19642,16
	KÜLTÜR-TAVUK	15898,58	50	26937,52	3809,54
Dana eti	FISH-DANA	31497,61	50	31538,16	4460,17
	KÜLTÜR-DANA	23899,32	50	27767,08	3926,85
Toplam	FISH-DANA	45095,67	100	101128,71	10112,87
	KÜLTÜR-DANA	19898,95	100	27512,29	2751,22

\*N: Örnek sayısı \*SD: Standart sapma \*SE: Ortalamının standart hatası

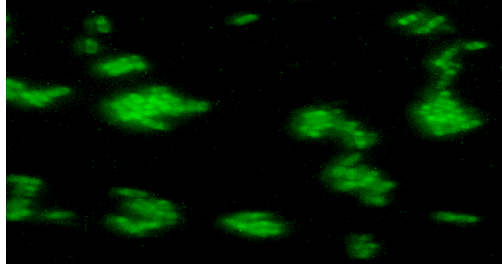
Çizelge 4.6. *E. coli* sayımlarının eşleştirilmiş t-testi sonuçları

<b>Materyal</b>	<b>Yöntem</b>	<b>Eşleştirilmiş gruplara ait farkların ortalaması</b>	<b>SD*</b>	<b>SE*</b>	<b>t*</b>	<b>df*</b>	<b>P*</b>
<b>Tavuk eti</b>	FISH-TAVUK/ KÜLTÜR- TAVUK	42795,16	122472,69	17320,25	2,471	49	0,017
<b>Dana eti</b>	FISH-DANA/ KÜLTÜR- DANA	7598,29	17251,78	2439,76	3,114	49	0,003
<b>Toplam</b>	FISH-TAVUK/ KÜLTÜR- TAVUK	25196,73	88792,83	8879,28	2,838	99	0,006

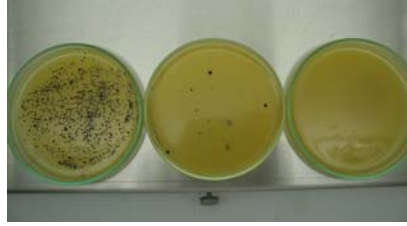
\*N: Örnek sayısı \*SD: Standart sapma \*SE: Ortalamannın standart hatası \*df: Serbestlik derecesi \*P: Önem düzeyi \*t: Belirli bir anlamlılık düzeyinde, t tablosuna göre bulunan teorik değer

#### 4.4.2. Gıda Örneklerindeki *S.aureus* Sayım Sonuçları

Türk Gıda Kodeksi et ürünleri için mikrobiyolojik kriterler tebliğine göre (Çizelge 3.2.) et ve et ürünlerinde bulunabilecek sınır *S.aureus* sayısı  $5 \times 10^3$  kob/ml dir. Çalışmamızda 100 et örneğinin hiçbirisinde sınır değerin üzerinde *S.aureus* hücrelerine rastlanmamıştır. *S.aureus* sayım sonuçları Çizelge 4.7.' de verilmiştir. Gıda örneklerinden izole edilen bir *E.coli* suşunun EC brothda gaz oluşturması Şekil 4.17' de ve *E.coli* kanıtlama testlerinden olan İndol testi sonucunda oluşan indol halkası Şekil 4.18.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. PB6 örneğindeki *S.aureus*' un Sau probu ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü



Şekil 4.21. PB6 örneğindeki *S.aureus*' un Baird Parker agardaki görüntüsü



Şekil 4.22. PB6 örneğindeki *S.aureus*' un (+) koagülaz reaksiyonu

Çizelge 4.7. Gıda örneklerinde, FISH ve kültürel yöntemlerle elde edilen *S. aureus* sayıları

Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)		Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)	
	1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar		1.tekrar	2. tekrar	1.tekrar	2. tekrar
<b>PB2</b>	9,0x10 <sup>2</sup>	7,9x10 <sup>2</sup>	9,1x10 <sup>2</sup>	8,7x10 <sup>2</sup>	<b>PP3</b>	5,8 x10 <sup>2</sup>	6,7 x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>	5,4 x10 <sup>2</sup>
<b>PB3</b>	2,6x10 <sup>2</sup>	3,4x10 <sup>2</sup>	4,1x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>	<b>PP4</b>	3,4 x10 <sup>2</sup>	4,9 x10 <sup>2</sup>	2,9 x10 <sup>2</sup>	3,6 x10 <sup>2</sup>
<b>PB4</b>	4,0x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>	3,7x10 <sup>2</sup>	<b>PP5</b>	3,7 x10 <sup>2</sup>	5,6 x10 <sup>2</sup>	5,7 x10 <sup>2</sup>	4,7 x10 <sup>2</sup>
<b>PB5</b>	5,8x10 <sup>2</sup>	4,7x10 <sup>2</sup>	6,8x10 <sup>2</sup>	6,3x10 <sup>2</sup>	<b>PP6</b>	6,5 x10 <sup>2</sup>	8,7 x10 <sup>2</sup>	4,8 x10 <sup>2</sup>	7,3 x10 <sup>2</sup>
<b>PB6</b>	4,1x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>	5,7x10 <sup>2</sup>	<b>PP7</b>	9,2 x10 <sup>2</sup>	8,5 x10 <sup>2</sup>	7,4 x10 <sup>2</sup>	8,4x10 <sup>2</sup>
<b>PB7</b>	7,4x10 <sup>2</sup>	8,4x10 <sup>2</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>	8,2x10 <sup>2</sup>	<b>TC2</b>	6,1 x10 <sup>2</sup>	6,7 x10 <sup>2</sup>	5,9 x10 <sup>2</sup>	5,3 x10 <sup>2</sup>
<b>PB8</b>	8,7 x10 <sup>2</sup>	8,3x10 <sup>2</sup>	9,1 x10 <sup>2</sup>	9,3x10 <sup>2</sup>	<b>TC3</b>	3,8 x10 <sup>2</sup>	4,9 x10 <sup>2</sup>	3,2 x10 <sup>2</sup>	3,1 x10 <sup>2</sup>
<b>PB9</b>	3,6 x10 <sup>2</sup>	4,5 x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>	5,1 x10 <sup>2</sup>	<b>TC4</b>	3,7 x10 <sup>2</sup>	5,6 x10 <sup>2</sup>	3,5 x10 <sup>2</sup>	4,8 x10 <sup>2</sup>
<b>PB10</b>	1,7 x10 <sup>2</sup>	2,4 x10 <sup>2</sup>	3,2 x10 <sup>2</sup>	3,4 x10 <sup>2</sup>	<b>TC5</b>	7,8 x10 <sup>2</sup>	3,6 x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>	5,6 x10 <sup>2</sup>
<b>PB11</b>	4,9 x10 <sup>2</sup>	4,8 x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>	4,9 x10 <sup>2</sup>	<b>TC6</b>	2,7x10 <sup>2</sup>	1,7x10 <sup>2</sup>	7,4 x10 <sup>2</sup>	6,7 x10 <sup>2</sup>
<b>PB12</b>	7,8 x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>	7,4 x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>	<b>TC7</b>	3,8x10 <sup>2</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>	4,8 x10 <sup>2</sup>	6,3 x10 <sup>2</sup>
<b>PB13</b>	2,7 x10 <sup>2</sup>	3,7 x10 <sup>2</sup>	2,9 x10 <sup>2</sup>	4,2 x10 <sup>2</sup>	<b>TC8</b>	8,3x10 <sup>2</sup>	9,1 x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>	8,2 x10 <sup>2</sup>
<b>PB14</b>	5,7 x10 <sup>2</sup>	5,8 x10 <sup>2</sup>	4,9 x10 <sup>2</sup>	5,9 x10 <sup>2</sup>	<b>TC9</b>	4,5 x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>	3,7 x10 <sup>2</sup>	2,9 x10 <sup>2</sup>

Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)		Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)	
	1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar		1.tekrar	2. tekrar	1.tekrar	2. tekrar
<b>PB15</b>	5,3 x10 <sup>2</sup>	5,9 x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>	6,7 x10 <sup>2</sup>	<b>TC10</b>	2,4 x10 <sup>2</sup>	3,2 x10 <sup>2</sup>	5,8 x10 <sup>2</sup>	4,9 x10 <sup>2</sup>
<b>PB16</b>	8,3 x10 <sup>2</sup>	9,6 x10 <sup>2</sup>	8,8 x10 <sup>2</sup>	9,8x10 <sup>2</sup>	<b>TC11</b>	4,8 x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>	3,6 x10 <sup>2</sup>	4,1 x10 <sup>2</sup>
<b>BPP2</b>	7,3 x10 <sup>2</sup>	8,7 x10 <sup>2</sup>	8,7x10 <sup>2</sup>	6,7x10 <sup>2</sup>	<b>TPK3</b>	6,9 x10 <sup>2</sup>	7,4 x10 <sup>2</sup>	6,4 x10 <sup>2</sup>	5,8 x10 <sup>2</sup>
<b>BPP3</b>	9,3 x10 <sup>2</sup>	9,7 x10 <sup>2</sup>	7,8 x10 <sup>2</sup>	6,9x10 <sup>2</sup>	<b>TPK1</b>	6,9 x10 <sup>2</sup>	7,4 x10 <sup>2</sup>	5,7 x10 <sup>2</sup>	7,4 x10 <sup>2</sup>
<b>TPK2</b>	9,6 x 10 <sup>2</sup>	10,9 x 10 <sup>2</sup>	5,9 x10 <sup>2</sup>	4,8x10 <sup>2</sup>	<b>DK4</b>	3,7 x10 <sup>2</sup>	5,6 x10 <sup>2</sup>	5,4 x10 <sup>2</sup>	4,3 x10 <sup>2</sup>
<b>TPK3</b>	4,3x10 <sup>2</sup>	4,4x10 <sup>2</sup>	3,9 x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	<b>DK5</b>	6,8 x10 <sup>2</sup>	7,7 x10 <sup>2</sup>	6,8 x10 <sup>2</sup>	7,3 x10 <sup>2</sup>
<b>TPK4</b>	5,8x10 <sup>2</sup>	7,6x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>	<b>DK6</b>	1,2 x10 <sup>2</sup>	3,4 x10 <sup>2</sup>	3,2 x10 <sup>2</sup>	2,4 x10 <sup>2</sup>
<b>TPK5</b>	8,9x10 <sup>2</sup>	7,6x10 <sup>2</sup>	8,9 x10 <sup>2</sup>	6,3x10 <sup>2</sup>	<b>DK7</b>	4,2 x10 <sup>2</sup>	4,8 x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	4,0 x10 <sup>2</sup>
<b>TPK6</b>	5,9x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>	5,4 x10 <sup>2</sup>	4,7x10 <sup>2</sup>	<b>DK8</b>	6,8 x10 <sup>2</sup>	6,4 x10 <sup>2</sup>	7,4 x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>
<b>TPK7</b>	8,3x10 <sup>2</sup>	7,9x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>	7,7x10 <sup>2</sup>	<b>DK9</b>	2,7 x10 <sup>2</sup>	3,5 x10 <sup>2</sup>	2,9 x10 <sup>2</sup>	4,3 x10 <sup>2</sup>
<b>TPK8</b>	8,5x10 <sup>2</sup>	9,8x10 <sup>2</sup>	9,4 x10 <sup>2</sup>	6,0x10 <sup>2</sup>	<b>DK10</b>	8,3 x10 <sup>2</sup>	9,6 x10 <sup>2</sup>	8,2 x10 <sup>2</sup>	9,8x10 <sup>2</sup>
<b>TPK9</b>	6,6x10 <sup>2</sup>	7,2x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>	7,3x10 <sup>2</sup>	<b>DK11</b>	7,3 x10 <sup>2</sup>	8,8 x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	6,7x10 <sup>2</sup>
<b>TPK10</b>	3,3x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	3,2 x10 <sup>2</sup>	2,3x10 <sup>2</sup>	<b>DK12</b>	9,3 x10 <sup>2</sup>	9,7 x10 <sup>2</sup>	7,8 x10 <sup>2</sup>	6,9x10 <sup>2</sup>
<b>TPK11</b>	2,0x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	1,0 x10 <sup>2</sup>	1,4 x10 <sup>2</sup>	<b>DK13</b>	3,6x10 <sup>2</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>	5,6 x10 <sup>2</sup>	3,4x10 <sup>2</sup>

Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)		Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)	
	1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar		1.tekrar	2. tekrar	1.tekrar	2. tekrar
<b>TPK12</b>	2,6x 10 <sup>1</sup>	2,8 x10 <sup>1</sup>	1,5x10 <sup>1</sup>	2,5 x10 <sup>1</sup>	<b>DK14</b>	8,4x10 <sup>2</sup>	9,1 x10 <sup>2</sup>	3,6 x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>
<b>TPK13</b>	5,2x 10 <sup>1</sup>	2,7x10 <sup>1</sup>	3,1x10 <sup>1</sup>	2,9 x10 <sup>1</sup>	<b>DK15</b>	8,3x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>	1,7 x10 <sup>2</sup>	4,7x10 <sup>2</sup>
<b>BPP4</b>	2,7x10 <sup>1</sup>	3,8x10 <sup>1</sup>	3,8x10 <sup>1</sup>	4,8 x10 <sup>1</sup>	<b>DK16</b>	9,8x10 <sup>2</sup>	3,2 x10 <sup>2</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>
<b>BPP5</b>	5,0x 10 <sup>1</sup>	6,3x10 <sup>1</sup>	5,2x10 <sup>1</sup>	6,9 x10 <sup>1</sup>	<b>DK17</b>	6,7x10 <sup>2</sup>	7,9x10 <sup>2</sup>	9,1x10 <sup>2</sup>	8,4x10 <sup>2</sup>
<b>PP1</b>	1,3x10 <sup>2</sup>	2,5 x10 <sup>2</sup>	4,2x10 <sup>1</sup>	1,4 x10 <sup>1</sup>	<b>DK18</b>	6,9x10 <sup>2</sup>	3,4x10 <sup>2</sup>	4,1x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>
<b>PP2</b>	3,1x10 <sup>2</sup>	2,4 x10 <sup>2</sup>	2,6x10 <sup>2</sup>	2,3x10 <sup>2</sup>	<b>DK19</b>	8,0x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>
<b>DK1</b>	3,6x10 <sup>2</sup>	4,8 x10 <sup>2</sup>	4,8x10 <sup>2</sup>	5,5x10 <sup>2</sup>	<b>DK20</b>	6,9x10 <sup>2</sup>	4,7x10 <sup>2</sup>	6,8x10 <sup>2</sup>	2,8 x10 <sup>2</sup>
<b>DK2</b>	5,2x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>	5,9x10 <sup>2</sup>	6,6x10 <sup>2</sup>	<b>DK21</b>	6,9x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>	2,7x10 <sup>2</sup>
<b>DK3</b>	7,2x10 <sup>2</sup>	6,9 x10 <sup>2</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>	3,3x10 <sup>2</sup>	<b>DK22</b>	6,1 x10 <sup>2</sup>	7,8 x10 <sup>2</sup>	4,4 x10 <sup>2</sup>	4,7x10 <sup>2</sup>
<b>DK23</b>	5,8x10 <sup>2</sup>	6,9x10 <sup>2</sup>	7,9 x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	<b>DK37</b>	4,3x10 <sup>2</sup>	4,4x10 <sup>2</sup>	3,9 x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>
<b>DK24</b>	6,7x10 <sup>2</sup>	5,8 x10 <sup>2</sup>	5,4x10 <sup>2</sup>	4,4 x10 <sup>2</sup>	<b>DK38</b>	9,8x10 <sup>2</sup>	7,2 x10 <sup>2</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>
<b>DK25</b>	5,9x10 <sup>2</sup>	6,1 x10 <sup>2</sup>	5,4 x10 <sup>2</sup>	4,7x10 <sup>2</sup>	<b>DK39</b>	5,8x10 <sup>2</sup>	6,7 x10 <sup>2</sup>	4,9 x10 <sup>2</sup>	5,9 x10 <sup>2</sup>
<b>DK26</b>	4,2 x10 <sup>2</sup>	9,6 x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	4,0 x10 <sup>2</sup>	<b>DK40</b>	8,7x10 <sup>2</sup>	6,7x10 <sup>2</sup>	8,7 x10 <sup>2</sup>	6,8x10 <sup>2</sup>
<b>DK27</b>	7,7x10 <sup>2</sup>	8,7 x10 <sup>2</sup>	7,8 x10 <sup>2</sup>	6,9x10 <sup>2</sup>	<b>DK41</b>	8,9x10 <sup>2</sup>	7,6x10 <sup>2</sup>	5,9 x10 <sup>2</sup>	6,3x10 <sup>2</sup>



Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)		Örnek kodu	FISH sonuçları (hücre/ml)		Kültürel Yöntem sonuçları (kob/ml)	
	1.tekrar	2.tekrar	1.tekrar	2.tekrar		1.tekrar	2. tekrar	1.tekrar	2. tekrar
<b>DK28</b>	$9,8 \times 10^2$	$9,7 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	<b>DK42</b>	$5,8 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	$4,9 \times 10^2$
<b>DK29</b>	$4,3 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$3,2 \times 10^1$	$1,4 \times 10^1$	<b>DK43</b>	$7,9 \times 10^2$	$6,6 \times 10^2$	$6,8 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$
<b>DK30</b>	$5,7 \times 10^2$	$9,1 \times 10^2$	$8,3 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	<b>DK44</b>	$9,8 \times 10^2$	$9,4 \times 10^2$	$5,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$
<b>DK31</b>	$5,3 \times 10^2$	$9,1 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	$6,3 \times 10^2$	<b>DK45</b>	$7,2 \times 10^2$	$6,9 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$
<b>DK32</b>	$6,9 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	<b>DK46</b>	$3,5 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$
<b>DK33</b>	$7,3 \times 10^2$	$9,8 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	<b>DK47</b>	$3,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
<b>DK34</b>	$9,3 \times 10^2$	$8,7 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$	$8,3 \times 10^2$	<b>DK48</b>	$2,8 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^1$
<b>DK35</b>	$9,1 \times 10^2$	$7,6 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	<b>DK49</b>	$7,3 \times 10^2$	$9,8 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$
<b>DK36</b>	$8,3 \times 10^2$	$7,9 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$	<b>DK50</b>	$8,3 \times 10^2$	$9,1 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$

#### 4.4.2.1. *S.aureus* sayım ortalamalarının istatistiki verileri

Bu çalışmada analiz edilen 100 gıda örneğinden FISH ve kültürel yöntem ile elde edilen *S.aureus* sayım sonuç ortalamaları eşleştirilmiş t-testi ile analiz edilmiş ve yöntemlerin sayım sonuçlarında farklılık yaratıp yaratmadığı değerlendirilmiştir. Çizelge 4.6.' da *S aureus* sayımlarına ait tanımlayıcı istatistikler, Çizelge 4.7.' de ise *S.aureus* sayımlarının eşleştirilmiş t-testi sonuçları verilmiştir. Buna göre, tavuk ve dana eti örnekleri üzerinde denenen iki yöntemden FISH yöntemi, kültürel yöntemle göre sayım ortalamalarında istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Bu farklar, dana eti için FISH yöntemi lehine, tavuk eti için ise sınırdadır. (Tavuk eti için FISH-Kültür:  $t=1,966$ ;  $df: 49$ ;  $P>0.05$ ; Dana eti için FISH-Kültür:  $t=7,180$ ;  $df: 49$ ;  $P<0.01$ ). Tavuk ve dana eti örneklerini birlikte değerlendirdiğimizde FISH yönteminin daha başarılı olduğu görülmektedir (Tavuk ve Dana materyalleri için FISH-Kültür:  $t=6,267$ ;  $df: 99$ ;  $P<0.01$ ).

Çizelge 4.8. *S. aureus* sayımlarına ait tanımlayıcı istatistikler

Materyal	Yöntem	Ortalama	N*	SD*	SE*
Tavuk eti	FISH-TAVUK	541,1100	50	268,83293	38,01872
	KÜLTÜR-TAVUK	503,9300	50	243,50108	34,43625
Dana eti	FISH-DANA	657,2300	50	208,61050	29,50198
	KÜLTÜR-DANA	491,5000	50	184,53530	26,09723
Toplam	FISH-DANA	599,1700	100	246,40406	24,64041
	KÜLTÜR-DANA	497,7150	100	215,03627	21,50363

\*N: Örnek sayısı \*SD: Standart sapma \*SE: Ortalamanın standart hatası

Çizelge 4.9. *S. aureus* sayımlarının eşleştirilmiş t-testi sonuçları

<b>Materyal</b>	<b>Yöntem</b>	<b>Eşleştirilmiş gruplara ait farkların ortalaması</b>	<b>SD*</b>	<b>SE*</b>	<b>t*</b>	<b>df*</b>	<b>P*</b>
<b>Tavuk eti</b>	FISH-TAVUK/ KÜLTÜR- TAVUK	37,1800	133,74640	18,91460	1,966	49	0,055
<b>Dana eti</b>	FISH-DANA/ KÜLTÜR- DANA	165,7300	163,20812	23,08111	7,180	49	0,000
<b>Toplam</b>	FISH-TAVUK/ KÜLTÜR- TAVUK	101,45	161,89	16,18	6,267	99	0,000

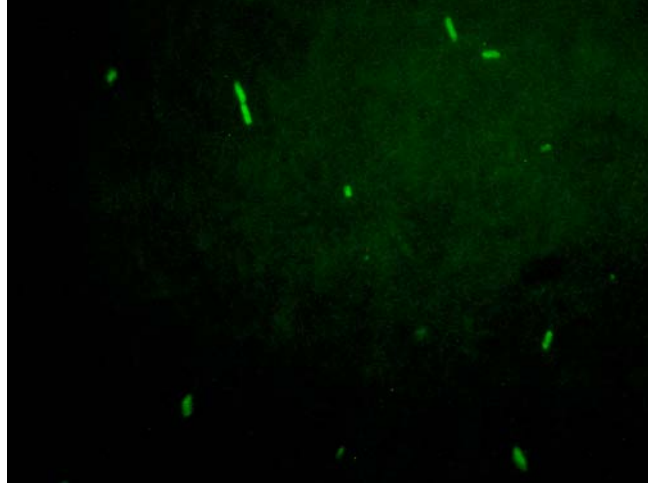
\*N: Örnek sayısı \*SD: Standart sapma \*SE: Ortalamannın standart hatası \*df: Serbestlik derecesi \*P: Önem düzeyi \*t: Belirli bir anlamlılık düzeyinde, t tablosuna göre bulunan teorik değer

#### 4.4.3. Gıda Örneklerindeki *Salmonella spp.* Bulguları

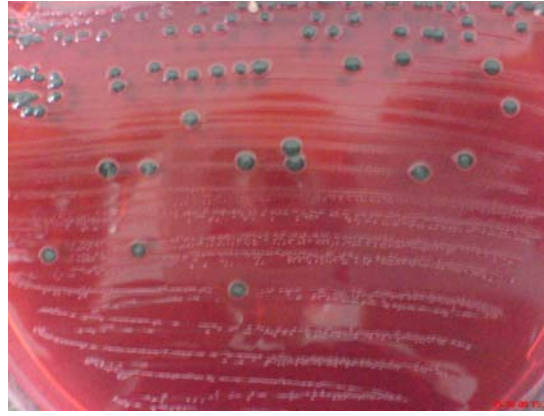
Gıdalarda patojen mikroorganizmaların kesinlikle bulunmasına izin verilmemesi nedeniyle bu çalışmada gıdalarda *Salmonella spp.* sayımı değil sadece saptaması yapılmıştır. İncelenen 100 örneğin 18' inde (Çizelge 4.10.) *Salmonella spp.* ye rastlanmıştır. Bu örneklerin 6 tanesinin piliç budu, geri kalan 12 tanesinin ise dana kıyma olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda *Salmonella* pozitif olan 18 örneğin sadece 3 tanesinin Aydın' da bulunan büyük bir alışveriş merkezi marketinden, geri kalan 15 tanesinin halk pazarından alındığı görülmüştür. Bu pozitif FISH sonuçlarının yanı sıra, kültürel yöntemler ile *Salmonella sp.* açısından negatif olduğu saptanan 12 örnekte *Salmonella spp.*' ye rastlanmıştır.

Çizelge 4.10. Gıda örneklerinde *Salmonella spp.* saptanan örnekler

Örnekler	FISH	Kültürel Yöntem
PB2	+	+
PB4	+	-
PB9	+	+
PB10	+	+
PB13	+	+
PB15	+	-
DK32	+	-
DK33	+	-
DK38	+	+
DK41	+	-
DK46	+	+
DK50	+	-
DK11	+	-
DK12	+	-
DK14	+	-
DK15	+	-
DK23	+	-
DK25	+	-



Şekil 4.23. PB1 örneğindeki *Salmonella spp.* nin Sal3 probe ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki (60X) görüntüsü



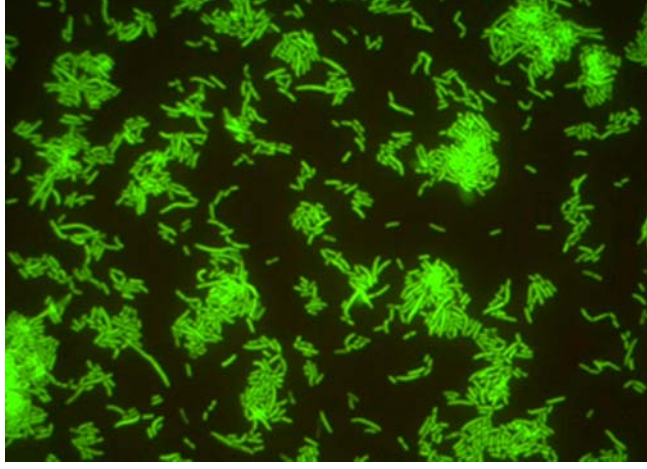
Şekil 4.24. PB1 örneğindeki *Salmonella spp.* nin XLD agardaki görüntüsü



Şekil 4.25. PB1 örneğindeki *Salmonella spp.* nin aglütinasyon reaksiyonu

#### 4.4.4. Su Örneklerindeki *Legionella* Bulguları

Sularda *Legionella* ve *E.coli* 'nin bulunmasına kesinlikle izin verilmemesi nedeniyle çalışmamızda bu bakterilerin su örneklerindeki varlığı/yokluğu araştırılmıştır. Aydın İl' inde Aytepe, Nazırlar, Askeriye, Aydın atık su arıtma tesisi, Kemer, Mimar Sinan Mahallesi su depoları ve İzmir/Gaziemir Ege Serbest Bölgesi içerisindeki yeşil alan sulama deposundan alınan 100 örnekte *Legionella* 'ya rastlanmamıştır. Bu nedenle hibridizasyon çalışmaları referans kültür *L.pneumophila* 5854 ile sürdürülmüştür. Şekil 4.26. da *L.pneumophila* 5854 suşunun Leg705 probe ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.26. *L.pneumophila* 5854 suşunun Leg705 probe ile hibridizasyonu sonucu epifloresans mikroskoptaki görüntüsü (60X)



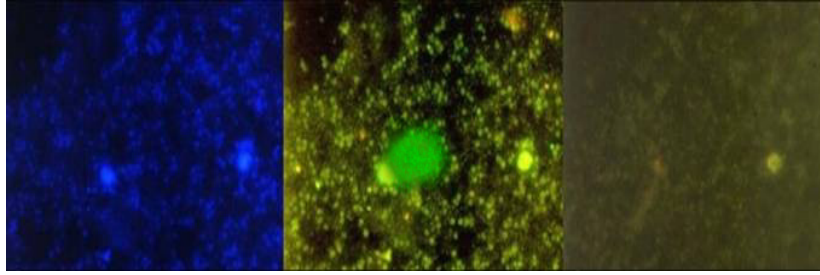
Şekil 4.27. *L.pneumophila* 5854 türünün BCYE agardaki görüntüsü

#### 4.4.5. Su Örneklerindeki *E.coli* Bulguları

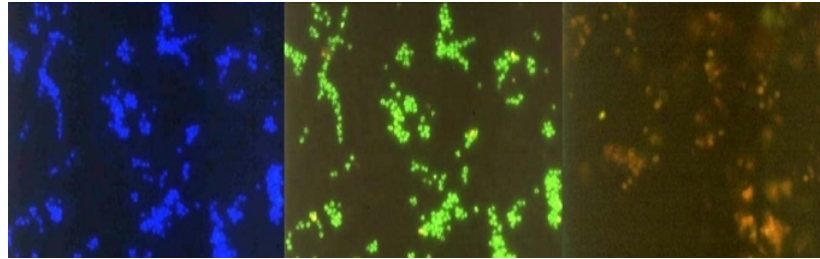
Aydın İl' inde Aytepe, Nazırlar, Askeriye, Aydın atık su arıtma tesisi, Kemer, Mimar Sinan Mahallesi su depoları ve İzmir/Gaziemir Ege Serbest Bölgesi içerisindeki yeşil alan sulama deposundan alınan 100 örnekte *E.coli*' ye rastlanmamıştır.

#### 4.5. FISH Tekniğinin Verimi

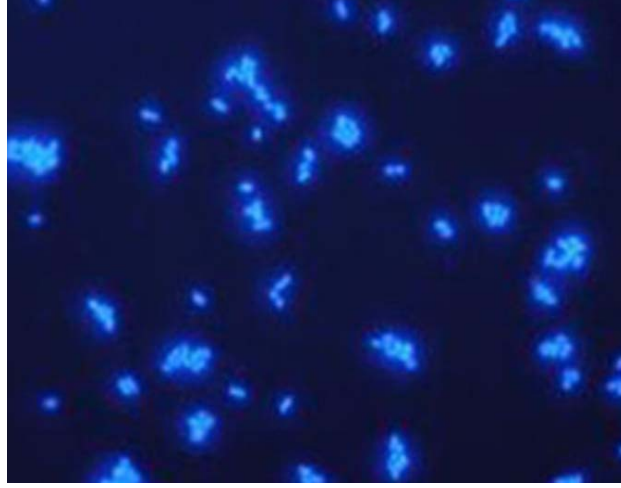
FITC işaretli problarla hibridizasyon sonunda Sau probu ile hibridize edilmiş 16 örnek ve ECO1167 probu ile hibridize edilmiş 10 örnek DAPI (1mg/ml) ile boyanarak floresans mikroskopta incelenmiş, fotoğraflanmış (Şekil 4.28., Şekil 4.29., Şekil 4.30.) ve sayımları yapılarak FISH tekniğinin verimi hesaplanmıştır. ECO1167 probu ile incelenen örneklerin hibridizasyon verimleri Çizelge 4.11.' de; Sau probu ile incelenen örneklerin hibridizasyon verimleri ise Çizelge 4.12.' de verilmiştir.



Şekil 4.28. *E.coli* hücrelerinin FITC işaretli ECO1167 probu ile hibridizasyonundan sonra a) DAPI filtre b) FITC filtre ile oluşan görüntüleri c) Non EUB 338 probu ile hibridizasyon sonrasında oluşan görüntü



Şekil 4.29. *S.aureus* hücrelerinin FITC işaretli Sau probu ile hibridizasyonundan sonra a) DAPI filtre b) FITC filtre ile oluşan görüntüleri c) NonEUB probu ile hibridizasyon sonrasında oluşan görüntü



Şekil 4.30. *E.coli* hücrelerinin DAPI ile boyanması sonucunda DAPI filtre altındaki görüntüsü

Çizelge 4.11. ECO1167 probu ile incelenen örneklerin hibridizasyon verimleri

Örnek kodu	FITC filtredeki sayım sonucu (hücre/ml)	DAPI filtredeki sayım sonucu (hücre/ml)	Verim (%)
DK37	$6,1 \times 10^2$	$7,9 \times 10^2$	77,2
DK38	$1,8 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	75,0
DK39	$4,3 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	87,8
DK40	$8,2 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$	95,3
DK41	$8,7 \times 10^4$	$9,4 \times 10^4$	92,6
DK42	$7,7 \times 10^4$	$8,9 \times 10^4$	86,5
DK43	$3,9 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	90,7
DK44	$6,4 \times 10^1$	$6,5 \times 10^1$	98,5
DK45	$8,3 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4$	100,0
DK46	$5,9 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	98,3
ORTALAMA VERİM			<b>90,1</b>



Çizelge 4.12. Sau probu ile incelenen örneklerin hibridizasyon verimleri

Örnek kodu	FITC filtredeki sayım sonucu (hücre/ml)	DAPI filtredeki sayım sonucu (hücre/ml)	Verim (%)
PB2	$5,9 \times 10^2$	$6,9 \times 10^2$	85,5
PB3	$2,6 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	76,5
PB4	$4,5 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	97,8
PB5	$5,8 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	86,6
PB6	$4,1 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	89,1
PB7	$7,4 \times 10^2$	$8,4 \times 10^2$	88,1
PB8	$8,7 \times 10^2$	$8,9 \times 10^2$	97,8
PB9	$3,6 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	80,0
PB10	$2,7 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	96,4
PB11	$4,9 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	98
PB12	$7,8 \times 10^2$	$7,9 \times 10^2$	98,7
PB13	$2,7 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	73,0
PB14	$5,7 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$	98,3
PB15	$5,3 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	89,8
PB16	$8,3 \times 10^2$	$9,6 \times 10^2$	86,5
BPP2	$7,3 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	91,8
BPP3	$9,3 \times 10^2$	$9,7 \times 10^2$	95,9
ORTALAMA VERİM			<b>90,0</b>

#### 4.6. FISH Tekniğinin Uygulanma Süresi

Çalışmamızda FISH tekniği için uygulanan her basamak tek tek değerlendirildiğinde; örneklerin hazırlanması için 20dk, hücrelerin toplanması için 10dk, fiksasyon için 3,5sa, geçirgenleştirme için 30dk, hibridizasyon için 18sa, yıkama için 30dk ve mikroskopik inceleme için 15dk olmak üzere toplam maksimum 24 saatte incelenen gıdalardaki *E.coli* ve *S.aureus* sayılarının belirlendiği gösterilmiştir.

#### 4.7. FISH Tekniğinin En Kısa Uygulanma Süresi

FISH tekniğinin uygulanma süresinin kısaltılması amacıyla ECO1167 probu kullanılarak  $6 \times 10^2$  kob/ml *E.coli* ATCC 35218 içeren kültür ile çalışılmıştır. Fiksasyon basamağı için 15 dakikadan 1 saate kadar değişen süreler denenerek, 18sa hibridizasyon uygulanmış, tüm hücreler DAPI ile boyanmış ve FISH verimi (FITC ile boyanan hücre sayısı / DAPI ile boyanan hücre sayısı) x 100 formülü ile hesaplanmıştır. 15dk sonundaki ortalama FISH verimi %73 iken 1sa sonundaki ortalama verimin % 98'e ulaştığı görülmüştür (Çizelge 4.13.).

Çizelge 4.13. Fiksasyon sürelerine göre FISH verimi

Fiksasyon Süresi (dk)	FITC filtredeki <i>E.coli</i> sayım sonucu (hücre/ml)	DAPI filtredeki <i>E.coli</i> sayım sonucu (hücre/ml)	Verim (%)
15	$3,5 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	73
20	$3,6 \times 10^2$	$4,9 \times 10^2$	73
25	$3,1 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	72
30	$3,3 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	73
35	$3,8 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	76
40	$4,2 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	76
45	$4,6 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	84
50	$5,0 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$	89
55	$5,4 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$	96
60	$5,9 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	<b>98</b>

Hibridizasyon süresinin kısaltılmasına yönelik yaptığımız araştırmalarda ise, fikstasyon basamağı 1sa olarak uygulanarak, hibridizasyon için 30dk ile 3sa arasında değişen süreler denenmiştir. 50dk sonunda FISH verimi %0 iken 1sa sonunda FISH verimi artmaya başlamış ve 3sa sonunda %97' ye ulaşmıştır (Çizelge 4.14.).

Elde edilen verilere dayanarak, fikstasyon için 1 saatin, hibridizasyon için ise 3 saatin yeterli olduğu bulunmuştur. Bu durumda, FISH tekniği ile *E.coli* sayımı için

gerekli olan en az sürenin, hücrelerin toplanması, yıkama ve mikroskopik sayım gibi aşamaların da dikkate alınmasıyla en az 8 saat olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Hibridizasyon sürelerine göre FISH verimi

Hibridizasyon Süresi (dk)	FITC filtredeki sayım sonucu (hücre/ml)	DAPI filtredeki sayım sonucu (hücre/ml)	Verim (%)
30	0	$4,0 \times 10^2$	0
40	0	$4,5 \times 10^2$	0
50	0	$4,3 \times 10^2$	0
60	$1 \times 10^1$	$5,2 \times 10^2$	2
70	$3 \times 10^1$	$5,0 \times 10^2$	6
80	$1 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	20
90	$2 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$	39
100	$3,5 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$	60
110	$3,8 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	70
120	$4,0 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	68
130	$4,2 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	70
140	$4,5 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	76
150	$4,8 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$	79
160	$5,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	83
170	$5,6 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	93
180	$5,7 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	<b>97</b>

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada ilk olarak, FISH tekniğinin beş farklı uygulamasının birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir. Bu yöntemlerin karşılaştırılması amacıyla, bilinen sayıda hücre içeren bakteri süspansiyonları hazırlanarak FISH tekniği ile sayımları yapılmıştır. Sayım sonucunun, gerçek değere yakınlığına, yöntemin uygulanış kolaylığına ve kirliliklerin azlığına göre yorum yapılarak çalışmanın ileriki aşamalarında uygulanacak yönteme karar verilmiştir.

Manz vd. (1992) tarafından geliştirilen lam üzerinde FISH tekniğinde, görüntüleme aşamalarında birçok kirlilikle karşılaşmış ve bu durum sayım yapılmasını güçleştirmiştir. Bu nedenle bu çalışmada kullanılmamıştır.

Heidelberg vd. (1993) tarafından ve örneğin solüsyon içerisinde fikse ve hibridize edildiği ve membran filtrede konsantre edildiği FISH tekniğinde, arka plan floresansının olmaması, prob tüketiminin azlığı ve yöntemin kullanımının kolaylığı gibi avantajlar gözlenmiştir. Aynı zamanda bilinen sayıda bakteri içeren kültürlerin FISH yöntemi ile sayımları sonucunda bu uygulama ile gerçek değere en yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenlerden dolayı çalışmanın ilerleyen aşamalarında Heidelberg vd. (1993)' nin geliştirdiği uygulama sırası kullanılmış fakat FISH protokolünde (3.2.3.) bulunan; örneklerin hazırlanması, fiksasyon, geçirgenleştirme ve hibridizasyon basamakları daha önceden yapılmış çalışmalar (Manz vd., 1992; Pernthaler vd., 2001; Furukava vd., 2006) göz önünde bulundurularak değiştirilmiştir.

Çalışmada Heidelberg vd. (1993)' nin önerdiği filtre üzerinde FISH tekniğine ek olarak, dört farklı uygulama daha denenmiştir. Bunlardan ilki, Tortorello ve Reineke (2000) tarafından geliştirilen ve örneğin sadece hibridizasyonunun filtre üzerinde gerçekleştirildiği teknikte, arka plan floresansının problem oluşturduğu ve prob tüketiminin fazla olduğu gözlenmiştir. Glockner vd., (1996) tarafından geliştirilen ve örneğin fiksasyonunun ve hibridizasyonunun polikarbonat membran filtreler üzerinde gerçekleştirildiği bir diğer uygulamada, yıkama, durulama ve hibridizasyon tamponunun ve probun eklenmesi aşamalarında filtrelerle sıklıkla temas edilmesi nedeniyle kirliliklerin arttığı gözlenmiştir. Yine Glockner vd. (1996) tarafından geliştirilen ve örneğin fiksasyonunun, hibridizasyonunun ve yıkama işleminin filtre üzerinde gerçekleştirildiği diğer bir uygulamanın, arka plan

floresansı problemi ve her bir örnek için ayrı bir filtre ünitesi kullanılması gerekmesiyle kullanışlı olmadığına karar verilmiştir.

Bu çalışmada gıda ve sularda bulunmasına kesinlikle izin verilmeyen mikroorganizmalardan olan *Salmonella spp.* ve *Legionella spp.*' nin ve gıdalarda bulunma sayısına sınırlandırmaların getirildiği *E.coli* ve *S. aureus*' un standart kültürel yöntemler ve FISH tekniği ile belirlenmesi ve sayımı ve yöntemlerin istatistiki olarak karşılaştırılması yapılmıştır.

FISH tekniği daha önce, denizler, sulama kanalları gibi birçok farklı alanda mikrobiyal çeşitliliğin çalışılmasında uygulanmıştır (Llobet- Brossa vd., 1998). FISH tekniğinin gıda ve su örneklerinde kullanımı, özellikle gıda kaynaklı patojenlerden olan *Staphylococcus* (Gory vd. 1999), *E.coli* (Regnault vd. 2000), *Salmonella* (Fang vd. 2003) genusları üzerinde yoğunlaşmıştır. Diğer taraftan, FISH tekniğinin en sık kullanım alanının, süt (Oliveira ve Bernardo, 2002), şarap (Blasco vd. 2003) gibi sıvı gıdalardaki bakteriyal floranın belirlenmesine yönelik olduğu görülmüştür.

FISH tekniği, katı ve kompleks gıdalarda çalışmamızda kullanılanlara benzer bakterilerin tespiti için daha önceden kullanılsa da (Huis in't Veld vd., 1994; Gory vd., 1999; Lake vd., 2002; Kitai ve Shimizu, 2005; Duffy vd., 2006; Pesavento vd., 2007), araştırmamız ile beraber Türkiye' de ilk defa et ürünlerinde *E.coli*, *Salmonella* ve *S.aureus* gibi üç önemli bakterinin aranması için FISH tekniği kullanılmıştır.

Bu araştırmada altı farklı prob için denenen 12 farklı hibridizasyon sıcaklığında (25°C, 27°C, 30°C, 35 °C, 37 °C, 39 °C, 40°C, 41 °C, 43 °C, 45 °C, 47 °C, 50 °C) yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda floresans sinyalin şiddetine göre görsel bir ayırım yapılarak problemlerin hibridizasyon sıcaklıkları EUB338, NonEUB338 ve Sau için 43°C, ECO1167 için 47°C, Sal3 için 37°C ve Leg705 için 45°C olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1.). Bu sonuç, kullanılan oligonükleotid problemlerin sinyal şiddetlerinin 25°C-35°C arasında minimum düzeyde olduğunu ve 35°C' den sonra arttığını göstermektedir. Benzer şekilde Tay vd. (2001)' nin yaptığı çalışmada, hibridizasyon sıcaklığı artırdıkça işaretli problemlerin hedef bölgeye bağlanarak floresans sinyal yayma oranlarının arttığı görülmüştür. Aynı çalışmada, EUB338'in floresans sinyal yoğunluğu floresans spektrofotometri tekniği ile ölçülmüş ve hibridizasyon 10-30°C' ler arasında yapıldığında sinyal

şiddetinin minimum seviyede olduğu, 30-45°C aralıklarında yapıldığında ise maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir.

Kullanılan problemlerin dizayn edildikleri türe olan özgüllüklerinin incelenmesi amacıyla her bir prob için karışık bakteri kültürleri hazırlanmıştır (Çizelge 4.2.). Türe özgü problemlerin karışık kültür içerisinde ilgili bakteri türünü seçip seçemedikleri, oluşturdukları floresans sinyal (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10. Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.) incelenerek gözlenmiştir. Bu çalışmada Sau, ECO1167 ve Sal3 problemlerinin, kendilerine özgü olmayan ikiye mikroorganizmanın daha bulunduğu karışık bakteriyel flora içerisinde hedeflendikleri türü kolayca seçebildikleri gösterilmiştir. Bu durum et ürünlerinde bulunması muhtemel *Bacillus* ve *Micrococcus* gibi bakterilerin içerisinde *Salmonella*, *E.coli* ve *S.aureus* gibi gıdalarda istenmeyen önemli bakterilerin belirlenmesi açısından önemlidir.

Bu çalışmada, bilinen sayıda bakteri hücresi içeren kültürlerin FISH ve kültürel yöntemlerle yapılan sayımları sonucunda, EUB 338, LEG 705 ve Sal 3 problemleri ile uygulanan FISH yönteminde kültürel yöntemle göre 1 logaritma daha fazla; Sau probu ile ise kültürel yöntemlerle aynı sayıda hücre belirlendiği gözlenmiştir (Çizelge 4.3.). Bjergbaek ve Roslev (2005)' in yaptığı bir çalışmada, FISH tekniğinin kültürel yöntemlere göre 10 kat fazla hücre belirleyebildiği belirtilmiştir. Larsson vd., (2009)' nin su örneklerinde yaptığı benzer bir çalışmada, belirlenebilen *E.coli* düzeyinin FISH yöntemi ile kültürel yöntemle göre 100 kat fazla olduğu belirtilmiştir.

Araştırmada elde edilen *E.coli* sayım sonuçlarına göre (Çizelge 4.4.); sınır değer (Çizelge 3.2.) üzerinde *E.coli* hücresi içeren 84 örnekten 42 tanesinin açıkta satılan et ürünleri (Ek 1) olduğu gözlenmiştir. Bu durum, gıda güvenliği ve kalite kontrol sistemlerinin benimsendiği işletmelerin yaygın olmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada 100 et örneğinin hiçbirisinde sınır değer (Çizelge 3.2.) üzerinde *S.aureus* hücresine rastlanmamıştır (Çizelge 4.7). Bu durumun *S.aureus*' un Türk Gıda Kodeksine göre gıdalarda bulunabilecek sınır değerinin *E.coli*' ye göre daha yüksek olması, *S.aureus*' un mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik tüm hijyen uygulamalarına karşı yüksek düzeyde duyarlılık göstermesi ve karışık kültürlerde özellikle *E.coli* gibi koliform grup bakteriler tarafından kolayca baskılanması (Erol, 1999) ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Araştırmada, FISH ve kültürel sayım yöntemleri ile 100 et örneğinde çift tekrarlı olarak *E.coli* ve *S.aureus* sayımı yapılmıştır. Sonuçlar eşleştirilmiş t-testi ile değerlendirilmiştir. *E.coli* sayım ortalamaları arasında elde edilen istatistiki sonuçlara göre (Çizelge 4.5., Çizelge 4.6.), tavuk ve dana eti örnekleri üzerinde denenen iki yöntemden FISH yönteminin kültürel yöntemle göre sayım ortalamalarında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunmuştur. Tavuk ve dana eti örneklerini istatistiki olarak birlikte değerlendirdiğimizde yine FISH yönteminin daha başarılı olduğu görülmektedir ( $P<0,01$ ).

Vieira-Pinto vd. (2007)' nin araştırmamıza benzer yaptığı bir çalışmada, kültürel metodla 39 örnekte *Salmonella* pozitif sonuç bulunurken, FISH yöntemi ile 115 tane *Salmonella* pozitif örnek bulunmuştur. Bu farkın istatistiksel olarak çok yüksek ( $P<0,001$ ) olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada incelenen 100 et örneğinde FISH ile yapılan sayımlara göre en az *E.coli* sayısının DK31 örneğinde ( $2,3 \times 10^1$  hücre/ml), en fazla *E.coli* sayısının ise TPK6 örneğinde ( $5,4 \times 10^5$  hücre/ml); kültürel mikrobiyolojik yöntemle yapılan sayımlara göre, en az *E.coli* sayısının DK32 örneğinde ( $1,7 \times 10^1$  kob/ml), en fazla *E.coli* sayısının ise TC11 örneğinde ( $9,1 \times 10^4$  kob/ml) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4.). Tez materyallerinin içerdiği *E.coli* sayıları; FISH analizlerinde elde edilen sonuçlarda  $2,3 \times 10^1$  hücre/ml- $5,4 \times 10^5$  hücre/ml aralığında, kültürel mikrobiyolojik analizlerde elde edilen sonuçlarda  $1,7 \times 10^1$  kob/ml- $9,1 \times 10^4$  kob/ml aralığında seyretmektedir. Örneklerin içerdiği *E.coli* sayılarının geniş aralıklarda seyretmesi *E.coli* sayımlarına ait istatistiksel hesaplamaların (Çizelge 4.5., Çizelge 4.6.) standart sapmasını yükseltmiştir, fakat bu durumun analizin güvenilirliği ile bir ilişkisi olmadığı düşünülmüştür.

Benzer şekilde, eşleştirilmiş t-testi ile *S.aureus* sayım ortalamaları arasında elde edilen sonuçlara göre (Çizelge 4.8., Çizelge 4.9.), tavuk ve dana eti örnekleri üzerinde denenen iki yöntemden FISH yönteminin kültürel yöntemle göre sayım ortalamalarında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunmuştur. Tavuk ve dana eti örneklerini istatistiki olarak birlikte değerlendirdiğimizde FISH yönteminin daha başarılı olduğu görülmektedir ( $P<0,01$ ).

İncelenen 100 et örneğinde FISH ile yapılan sayımlara göre en az *S.aureus* sayısının TPK12 örneğinde ( $2,6 \times 10^1$  hücre/ml), en fazla *S.aureus* sayısının ise TPK2 örneğinde ( $10,9 \times 10^2$  hücre/ml); kültürel mikrobiyolojik yöntemle yapılan

sayımlara göre, en az *S.aureus* sayısının DK48 örneğinde ( $1,0 \times 10^1$  kob/ml), en fazla *S.aureus* sayısının ise DK10 örneğinde ( $9,8 \times 10^2$  kob/ml) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.7.). Tez materyallerinin içerdiği *S.aureus* sayıları; FISH analizlerinde elde edilen sonuçlarda  $2,6 \times 10^1$  hücre/ml- $10,9 \times 10^2$  hücre/ml aralığında, kültürel mikrobiyolojik analizlerde elde edilen sonuçlarda  $1,0 \times 10^1$  kob/ml- $9,8 \times 10^2$  kob/ml aralığında seyretmektedir. Örneklerin içerdiği *S.aureus* sayılarının dar aralıklarda seyretmesi *S.aureus* sayımlarına ait istatistiksel hesaplamaların standart sapmalarının (Çizelge 4.8., Çizelge 4.9.) *E.coli* sayımlarına ait standart sapmadan düşük olmasına neden olmuştur.

İncelenen 100 et örneğinin 18' inde *Salmonella* sp. saptanmıştır (Çizelge 4.10). Dikkat çekici olarak, *Salmonella* pozitif olan 18 örneğin 6 tanesinin piliç budu, geri kalan 12 tanesinin ise dana kıyma olduğu gözlenmiş ve sadece 3 tanesinin Aydın' da bulunan büyük bir alışveriş merkezi marketinden, geri kalan 15 tanesinin Aydın halk pazarlarından alındığı görülmüştür (Ek 1). Bu pozitif FISH sonuçlarının yanı sıra, kültürel yöntemler ile *Salmonella* sp. açısından negatif olduğu saptanan 12 örnekte *Salmonella* sp.' ye rastlanmıştır. Kültürel yöntemlere göre pozitif FISH sonuçların daha yüksek çıkmasının nedeni De Medici vd. (1998)' nin de belirttiği gibi *Salmonella* izolasyonunu engelleyen rekabetçi bir bakterinin ortamda bulunma olasılığı ile ilişkilendirilebilir. Diğer taraftan, kültürel yöntemler ile saptanamayan örneklerde FISH yöntemi ile *Salmonella* varlığının saptanması, FISH tekniği gibi mikroskopik sayım yöntemlerinin, kültürel yöntemlere olan avantajlarından biri olan canlı ve cansız tüm hücrelerin görüntülenebilmesi avantajını vurgulamaktadır (Bottari vd., 2006).

7 farklı depodan alınan 100 su örneğinde FISH ve kültürel yöntem ile *E.coli* ve *Legionella* aranmıştır. Alınan 100 su örneğinin hiçbirisinde her iki yöntemle de *E.coli* ve *Legionella* saptanamamıştır. Bu durum su depolarında, duvarlarının suyu sızdırmayacak şekilde sıvanması, bakım ve temizlik için bulundurulmuş kapak ve havalandırma deliğinin çok iyi korunması, içine kuşların, sürüngen kemirici sinek ve böceklerin girmesine olanak sağlanmaması, deponun kapağının sızdırmaz materyalden yapılmış olması ve kilitli tutulması, boru bağlantılarının sızdırmayı önleyecek şekilde yapılması, deponun bakım ve onarımlarının konunun uzmanı kişilerce ve periyodik olarak yapılmasının bakteri kontaminasyonu önlediğini düşündürmüştür. Çalışmamızda, *Legionella pneumophila* saf kültürü ile çalışılarak FISH tekniği ile görüntüleme ve sayım yapılmıştır. Wilks ve Keevil (2006), Manz vd. (1995), Amann vd. (1995), Juretschko vd. (1998) ve Wagner vd. (1998)



tarafından yapılan çalışmalarda farklı habitatlarda *Legionella* spp. ve *Legionella pneumophila* aranmıştır ve FISH tekniği ile başarı ile belirlenebilmiştir. Bu da kültüre edilmesi zor olan türlerin FISH tekniği ile, kompleks çevrelerde dahi belirlenebildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, ECO1167 probu ile incelenen 10 örneğin ortalama hibridizasyon verimleri %90,1 (Çizelge 4.11.), Sau probu ile incelenen 17 örneğin ortalama hibridizasyon verimleri %90 (Çizelge 4.12.) olarak belirlenmiştir. Delong vd. (1999) tarafından yapılan çalışmada bu çalışmaya benzer şekilde FISH tekniği ile planktonik hücrelerin tanımlanması ve sayımı yapılmıştır. Sonuçta, DAPI ile boyanarak belirlenmiş toplam hücre sayısının, bakteriyal ve arkeal problemler kullanılarak uygulanan FISH tekniği sayesinde %90-100 oranında belirlenebildiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Türk Gıda Kodeksi' ne (Çizelge 3.2.) göre gıdalarda bulunmasına izin verilmeyen, analizlerinde negatif örneklerin belirlenmesi için en az 3 gün gereken *Salmonella* analizinin dahi en fazla 24 saat gibi kısa bir sürede yapılabildiği ortaya koyulmuştur (4.6.). Benzer olarak Oliveira vd. tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada, FITC işaretli *Salmonella*' ya özgü prob ve rhodamin işaretli *L.monocytogenes*' e özgü prob kullanılarak, süt örneklerinde *Salmonella* spp. ve *L.monocytogenes* aranmıştır ve FISH tekniğinin ilgili bakteri türlerinde ortalama 5 gün içinde sonuç almayı sağlayan kültürel yöntemlere göre avantajları açıklanmıştır.

FISH tekniğinde gerekli zamanın azaltılması amacıyla her bir basamak yeniden değerlendirilmeye alınmıştır. Bu amaçla *E.coli* hücreleri ile çalışılmıştır. 15dk PFA fiksasyonu uygulaması sonunda *E.coli* hücrelerinin belirlenmesindeki ortalama FISH verimi %73 iken 1sa fiksasyon sonundaki ortalama verimin % 98'e ulaştığı görülmüştür (Çizelge 4.13.). Bu sonuç *E.coli* hücrelerinin FISH ile analizinde fiksasyon için 1 saatin yeterli olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın diğer bir kısmında hibridizasyon süresinin kısaltılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. 30dk sonunda FISH verimi %0 iken 1sa sonunda FISH verimi artmaya başlamış ve 3sa sonunda %97' ye ulaşmıştır (Çizelge 4.14.). Bu sonuç *E.coli* hücrelerinin FISH ile analizinde 3 saatin hibridizasyon için gerekli minimum süre olduğunu göstermektedir.

Bu araştırmada, örneklerin hazırlanması, hücrelerin toplanması ve görüntüleme aşamalarıyla beraber toplam 8 saatin FISH yöntemi ile *E.coli* sayımı için yeterli olduğu belirlenmiştir. Her işlenmiş gıdada bulunmasına sınırlamaların getirildiği, fekal kontaminasyonun en önemli belirteçlerinden olan ve EMS yöntemiyle en az 3 günde belirlenen *E.coli*' nin, FISH yöntemi ile 8sa içerisinde sayılması gıda güvenliği uygulamaları için önemlidir. Ootsubo vd. (2003)' nin *E.coli* kültürü ile yaptığı benzer çalışmaya göre fiksasyon için 5dk ve hibridizasyon için 5dk olmak üzere diğer aşamalarla beraber toplam 1 saatin analiz için yeterli olduğu açıklanmıştır. Fakat hücre sayısının az olması nedeniyle 0,4μm por çapındaki filtre ile toplanan hücreler 6sa triptik soy agar içeren petrilerde 37°C' de inkübe edilmiş ve ardından hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu durumda toplam analiz süresinin 7sa olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde, Oliveira ve Bernardo (2002) ve Blasco vd. (2003)' nin çalışmalarına göre, FISH tekniği ile 7 saatte *Salmonella* analizi yapılabildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar araştırmamızı doğrular niteliktedir.

Yapılan bu araştırmada, FISH tekniği tek bir floresans boya (FITC) ile uygulanmıştır. Çalışmanın ilerideki aşamalarında oklu FISH yöntemi uygulanarak aynı anda birden fazla boya ile işaretili problemlerin kullanılmasıyla birden fazla bakterinin belirlenmesi ayrıca gıdalar çeşitlendirilerek FISH tekniğinin uygulanması amaçlanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, FISH yöntemi aynı anda farklı boylarla işaretili problemlerle uygulanmıştır (Stender vd., 2001). Bu yöntem genellikle, *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella spp.*, ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi indikatör bakterilerle çalışılmıştır.

Patojen ve indikatör mikroorganizmaların belirlenmesi ve sayımı için kullanılan teknikler küresel gıda tedarikiğinin güvenliğini sağlamaya yardımcı olmaktadır. Günümüzün gıda üretimi, işlemesi ve dağıtımı, gıda patojenlerinin hızlı ve etkili bir şekilde belirlenmesine ihtiyaç duymaktadır. Uygun metodların bulunması ürünlerin geri çağırılmasını ve salgınların ortaya çıkmasını engellemek açısından oldukça önemlidir. Klinik yönden, hızlı belirleme tekniklerinin kullanılması hastalığın teşhisinin daha çabuk yapılmasına ve maliyet azalışına olanak sağlayacaktır. Günümüzde kullanılan hızlı tekniklerden olan immunolojik testler özgüllük ve hassasiyet açısından, PCR gibi nükleik asit amplifikasyonu teknikleri ise örnekten kaynaklanan inhibisyon etkileri nedeni ile yetersiz kalmaktadır. Nükleik asit bazlı tekniklerin özgüllüğünü ve immunolojik testlerin örnekten bağımsızlık, güvenilirlik, hızlılık ve basitlik gibi özelliklerini beraber barındıran

FISH tekniğinin kullanılması hem gıda hem de sağlık sektörleri için çok değerlidir.

Araştırmanın katma değeri; *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella* ve *Legionella* gibi halk sağlığı açısından önemli bakterilerin güvenilir, uygulaması kolay ve kültürel yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç veren bir teknikle sayımı ve belirlenmesi olarak nitelendirilebilir. Aynı zamanda FISH yönteminin hızlı bir görüntüleme sistemi olarak gıda sektöründe kullanılması şüpheli pozitif sonuçların kanıtlanması için harcanan zaman kaybının önlenmesi ve tüketicilerin mikrobiyolojik risklerden hızlı bir şekilde korunması açısından avantajlıdır.

**KAYNAKLAR**

- Aabo, S., Rasmussen, O.F., Rossen, L., Sorensen, P.D., Olsen, J.E. 1993. *Salmonella* identification by the Polymerase Chain Reaction. **Mol. Cell. Probes**, 7: 171–178.
- Abeliovich, A. 1992. Transformations of ammonia and the environmental impact of nitrifying bacteria. **Biodegradation**, 3: 255–264.
- Adams, M.R., Moss, M.O., 1995. Food Microbiology, University of Surrey, Guildford, UK. The Royal Society of Chemistry *Aeromonas* and *Plesiomonas* in: Foodborne pathogens, Hazard, risk analysis and control.
- Adıgüzel, T. 2008. AB' ye gıda ürünleri ihracatının gıda güvenliği açısından değerlendirilmesi. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Dış İlişkiler ve Avrupa Birliği Koordinasyon Dairesi Başkanlığı, AB Uzmanlık Tezi, Ankara.
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. **J. Bacteriol.**, 172: 762-770.
- Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, 59(1), 143–169.
- Amann, R., Ludwig, W., 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**, 24: 555–565.
- Amann, R., Fuchs B.M., Behrens S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *In Situ* Hybridisation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 12(3): 231-236.
- Anonim, 2010. Elektronik mikrobiyoloji dergisi. Gıda mikrobiyolojisi- indikatör mikroorganizmalar. <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/942000330.pdf>. Erişim tarihi: 12.08.2011.
- AOAC. 1990. Official Methods Of Analysis, 19th Ed., Assoc. Official Analytical Chemists, Arlington, V.A.
- Aran, N. 2010. Gıda Biyoteknolojisi. Nobel yayınevi, 494 sayfa, Türkiye.
- Arbuthnott, J.P., Coleman, D.C. and Azavedo, J.S. 1990. Staphylococcal toxins in human disease. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.**, 101-107.
- Armstrong, G.L., Hollingsworth, J., Morris, J.G., 1996. Emerging food borne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed World. **Epidemiol. Rew.**, 18: 29-51.

- Ayres, J.C., Mundt, J.O., Sandine, W.E., 1990. Microbiology of Foods. W. H. Freeman and Comp., San Francisco.
- Bartie C., Venter S.N., and Nel, N.H. 2000. Evaluation of detection methods for *Legionella* species using seeded water samples. **Water S.A.**, 27(4): 375-380.
- Bell, C., Kyriakides, A., 2002. Pathogenic *Escherichia coli* in foodborne pathogens, hazard, risk analysis and control. CRC Press, 279-306.
- Bertaux, J., Gloger, U., Schmid, M., Hartmann, A., Scheu, S. 2007. Routine fluorescence in situ hybridization in soil. **Journal of Microb. Methods**, 69: 451-460.
- Betzl, D., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1990. Identification of *Lactococci* and *Enterococci* by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 56: 2927-2929.
- Blasco, L., Ferrer, S., Pardo, I. 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. **Fems Microbiol. Lett.**, 225: 115-123.
- Bjergbaek, L. A., Roslev, P. 2005. Formation of nonculturable *Escherichia coli* in drinking water. **Journal of Applied Microbiology**, 99: 1090-1098.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., Neviani, E. 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 73: 485-494.
- Bukowski, M., Wladyka, B., Dubin, G., 2010. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins**, 2: 1148–1165.
- Butaye, P., Michael, G. B., Schwartz, S., Barrett, T. J., Brisabois, A., White, D. G., 2006. The colonial spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**, 8: 1891–1897.
- Cano, R.J., Torres, M.J., Klem, R.E., Palomare, J.C. and Casadesus, J. 1992. Detection of *Salmonellae* by DNA hybridization with a fluorescent alkaline phosphatase substrate. **J. Appl. Bacteriol.**, 72: 393-399.
- Capita, R., Alvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., Garcia-Fernandez, M.C. 2002. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain. **I. J. Food Microbiol.**, 81(2): 69-173.
- Coia, J.E., 1998. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 20: 1-9.

- Coşkuner, G. 2002. A new molecular technique for the identification of microorganisms in biological treatment plants: Fluorescent *In Situ* Hybridization. **Turk J. Biol.**, 26: 57-63.
- Cox, J., 1999. *Salmonella* in; Encyclopedia of Food Microbiology, Volume 2. Robinson, R.K., Academic Press, 1929-1937, Great Britain.
- Curiale, M.S., Mciver, D., Weathersby, S. and Planer, C. 1990. Detection of *Salmonellae* and other *Enterobacteriaceae* by commercial deoxyribonucleic acid hybridization and enzyme immunoassay kit. **J. Food Prot.**, 53: 1037-1044.
- Çarlı, K.T., 2003. Kanatlı hayvanların infeksiyöz hastalıkları, U. Univ., Veteriner Fak. Yayınları, 15-33, Bursa.
- D'Aoust, J.Y., 2000. *Salmonella* Chapter 45 in: 'The microbiological safety and quality of food', Edited by; Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W., 2: 1233-1299.
- Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K.H. Schleifer, and M. Wagner. 1999. The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **System. Appl. Microbiol.**, 22: 434-444.
- Daims, H., Ramsing, N.B., Schleifer, K.H., Wagner, M. 2001. Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by *fluorescence in situ* hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 5810-5818.
- De Medici, D., Pezzotti, G., Marfoglia, D. 1998. Comparison between ICS-VIDAS, MSR/V and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. **Int. J. Food Microbiol.**, 45: 205-210.
- Delong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. **Science**, 243:1360-1363.
- Delong, E.F., Taylor, L.T., Marsh, T.L., Preston, C.M. 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(12): 5554-5563.
- Dondero, T.J., Rendtorff, R.C., Mallison, G.F. 1980. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. **N. Engl. J. Med.**, 302: 365-70.

- Doyle, M.P., Cliver, D.O. 1990. *Escherichia coli*, Chapter 13, "Foodborne Diseases". Academic Press, Inc, p: 209-215, San Diego, California 92101, USA.
- Duffy, G., Cummins, E., Nally, P., O'Brien, S., Butler, F. 2006. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. **Meat Science**, 74: 76-88.
- Ekici, L., Telli, R., Yetim, H. 2008. Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyon bakterileri-I. **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, ISSN: 1306-7648; 2: 29-42, Türkiye.
- Ercolini, D., Hill, P.J., Dodd, C.E.R. 2003. Development of a fluorescence *in situ* hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. **J. Microbiol. Methods**, 52: 267-271.
- Erol, D., 1999. Besin Hijyeni, Ankara Univ. Vet Fak., 81-92, Ankara.
- Eyice, Ö. 2004. Determination of nitrifying bacteria in a full-scale activated sludge system using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique. İstanbul Technical University, Institute of Science and Technology, Msc. Thesis, 75 Sayfa, İstanbul.
- Fang, Q., Brockmann, S., Botzenhart, K., Wiedenmann, A. 2003. Improved Detection of *Salmonella* spp. in foods by fluorescent *in situ* hybridization with 23S rRNA probes: A comparison with conventional culture methods. **J. Food Prot.**, 66(5): 723-731.
- Flowers, R.S. Mozola, M.A., Curiale, M.S., Gabis, D.A. and Silliker, J.H. 1987. Comparative study of a DNA hybridization method and the conventional culture procedures for detection of *Salmonella* in food. **J. Food Sci.**, 52: 781-785.
- Food and Drug Administration (FDA), 1984. Final Printed Labeling for the Drug Flunisolide. FDA Approved 1984.
- Furukava, H., Hoshino, T., Tsuneda, S., Inamori, Y. 2006. Comprehensive analysis of cell wall-permeabilizing conditions for highly sensitive fluorescence *in situ* hybridization. **Microbes Environ.**, 21(4): 227-234.
- Glockner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K., Schleifer, K. 1996. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. **Systems Applied Microbiology**, 19: 403-406.
- Gory, L., Millet, L., Godon, J.J., Montel, M.C. 1999. Identification of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus warneri* Isolated from meat

by fluorescent *in situ* hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Syst Appl. Microbiol.**, 22: 225-228.

Göktan, D., 1990. Gıdaların Mikrobiyal Ekolojisi, Ege Univ. Müh. Yayınları, Bornava-İzmir.

Gunasekera, T.S., Dorsch, M.R., Slade, M.B., Veal, D.A. 2003. Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using ribosomal RNA directed probes. **Journal of Applied Microbiology**, 94; 936-945.

Haimovich, B., Venkatesan, M.M. 2006. *Shigella* and *Salmonella*: death as means of survival. **Microbes and Infection**, 8: 568-577.

Hayes, P.R., 1995. Food Microbiology and Hygiene, Department of Microbiology University of Leeds UK, Chapman&Hall, 2:31-40.

Head, I.M., Saunder, S.J.R., Picku, P.R.W. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecol.**, 35(1).

Heidelberg, J.F., O'neill, K.R., Jacobs, D., Colwell, R.R. 1993. Enumeration of *Vibrio vulnificus* on membrane filters with a fluorescently labeled oligonucleotide probe specific for kingdom-level 16S rRNA sequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, 59(10): 3474-3476.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams & Wilkins: A Waverly Company. 787 p., America.

<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2000-4.html>

Huis in't Veld, J.H.J., Mulder, R.W.A.W., Snijders, J.M.A., 1994. Impact of animal husbandry and slaughter technologies on microbial contamination of meat: monitoring and control. **Meat Science**, 36: 123-154.

ICMSF, 1996. Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).

Izat. A.L., Driggers, C.D., Colberg, M., Reiber M.A. and Adams, M.H. 1989. Comparison of the DNA probe to culture methods for the detection of *Salmonella* in poultry carcasses and processing water. **J. Food Prot.**, 53: 1037-1044, 52: 564-570.

Janet, E., Stout, PH.D., Victor, L., Yu, M.D. 1997. Legionellosis. **The New England Journal of Medicine**, 337: 682-687.



- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology. 7th edition. Springer Science and Business Media Inc. 790 p., America.
- Jo, M., Kim, J., Lim, J., Kang, M., Koh, H., Park, Y., Yoon, D., Chae, J., Eo, S., Lee, J.H., 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. **Int. J. Food Microbiol.**, 95: 41-49.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommering-Röser, A., Koops, H.P., Wagner, M. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 3042-3051.
- Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M., Schmidt, H. 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 34: 229-243.
- Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R., Barer, M.R. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. **Antonie Von Leeuwenhoek**, 73: 169-187.
- Kempf V. A., Trebesius K., Autenrieth I.B. 2000. Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 830-838.
- Kitai, S., Shimizu, A. 2005. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, 67(3): 269-274.
- Kobabe, S., Wagner, D., Pfeifferem, E.M. 2004. Characterization of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence *in situ* hybridization. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 50: 13-23.
- Lake, R., Hudson, A., Cressey, P. 2002. Risk Profile: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in red meat and meat products. Institute of Environmental Science & Research Limited Christchurch Science Centre, New Zealand.
- Larsson, S., Mezule, L., Juhna, T. 2009. Rapid and specific quantification of indicator bacteria in biofilms and water concentrates. Techneau, D.3.6.8.5. A validation report for the developed system(s) for rapid and specific quantification of indicator bacteria and pathogens on filter membranes.
- Lazcka, O., Campo, F.J.D., Munoz, F.X. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 22(7): 1205-1217.
- Leloğlu N., Arda, M., Minbay, A., Aydın, N. ve Akay, O. 1997. Gram pozitif koklar, Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, 2: 31-39, Ankara.

- Lin, C.K., Tsen, H.Y. 1999. Comparison of the partial 16S rRNA gene sequences and development of oligonucleotide probes for the detection of *Escherichia coli* cells in water and milk. **Food Microbiol.**, 16: 551–562.
- Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R., Amann, R. 1998. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 2691-2696.
- Lye, D., Fout, G.S., Crout, S.R., Danielson, R., Thio, C.L., PaszkoKolva, C.M. 1997. Survey of ground, surface, and potable waters for the presence of *Legionella* species by EnviroAmp® PCR *Legionella* kit, culture, and immunofluorescent staining. **Water Res.**, 31: 287-293.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M., Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. 8th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, p.166, New Jersey.
- Mahbubani, M., Bej, A.K., Di-Cesare, J.L., Miller, R., Haff, L. and Atlas, R.M. 1990. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. **Mol. Cell. Probes**, 4: 175-187.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T., Garrity, G.M., Larsen, N., Bing, L., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., Woese, C.R. 1999. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Res.**, 27:171-173.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. **Syst. Appl. Microbiol.**, 15: 593-600.
- Manz, W., Amann, R., Szewzyk, R., Szewzyk, U., Stenström, T.A., Hutzler, P., Schleifer, K.H. 1995. *In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. **Microbiology**, 141: 29-39.
- Martin, S.,E., Iandolo, J.J., 1999. *Staphylococcus* in: Encyclopedia of Food Microbiology, London. Edt: Robinson RK, Batt, CA, Patel PD. Academic Press.
- McDade, J.E., Brenner, D.J., Bozeman, F.M. 1979. Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. **Ann Intern Med.**, 90:659-61.
- McDade, J.E., Sheppard, C.C., Fraser, D.W. 1977. Legionnaires disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory diseases. **N. Engl. J. Med.**, 287: 1197-1203.

- Mutluer, B., 1991. Kanatlı etlerinde *Salmonella* Kontrolü, Uluslararası Tavukçuluk Kongresi, 22-25 Mayıs, İstanbul.
- Neef, A., Amann, R., Schleifer, K.H. 1995. Detection of microbial cells in aerosols using nucleic acid probes. **Syst Appl Microbiol.**, 18: 113-122.
- Nordentoft, S., Christensen, H., Caspar Wegener, H. 1997. Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for *in situ* detection of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. **Journal of Clinical Microbiology**, 35(10): 2642-2648.
- Oliveira, M., Bernardo, F. 2002. Fluorescent *In Situ* Hybridization aplicado à detecção rápida de *Salmonella* de origem alimentar e ambiental. **Rev. Port. Cien. Vet.**, 97: 81-85.
- Oliveira, M., Blasco, L., Ferrer, S., Bernardo, F. 2004. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in milk by Fluorescent *In Situ* Hybridisation. **Rev. Port. Cien. Vet.**, 99(552): 215-218.
- Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Ezura, Y. 2003. Seven-hour fluorescence *in situ* hybridization technique for enumeration of *Enterobacteriaceae* in food and environmental sample. **Journal of Applied Microbiology**, 95: 1182-1190.
- Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2006. Cilt: 04 Sayı: 05 Sayfa: 6–10.
- Park, S., Worobo, R., Durst, R., 1999. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging food borne pathogen: a literature review. **Crit. Rev. in Food Science and Nutrition**, 39: 481–502.
- Pernthaler, J., F. O. Glöckner, Schönhuber, W., Amann, R. 2001. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Methods Microbiol.**, 30: 207-226.
- Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R. 2002. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. **Applied & Environmental Microbiology**, 68 (6): 3094-3101.
- Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N. ve Lo Nostro, A. 2007. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control**, 18(3): 196-200.
- Popoff, M.Y., Bockemuhl, J., Brenner, F.W., 1998. Supplement to the Kauffmann-White Scheme. **Res. Microbiol.**, 149: 601-604.
- ProbeBase. <http://www.microbial-ecology.net/probebase/>

- Ray, B., 1996. Foodborne Toxicoinfections, in fundamental food microbiology, CRC Press, 323-327.
- Regnault, B., Martin-Delautre, S., Lejay-Collin, M., Lefèvre, M., Grimont, P.A.D. 2000. Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli/Escherichia fergusonii* cells by *in situ* hybridization: specificity and potential applications. **Res. Microbiol.**, 151: 521-533.
- Schwartz, J.I.K., Eckert, W., Conrad, R. 2007. Community structure of archaea and bacteria in profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). **Systematic and Applied Microbiology**, 30: 239-254.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posh, T., Amann, R. 2003. An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2928.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., . Sorensen, D.D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry O'keefe, H., Sage, A., Young, B., Coull, J. 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 938-941.
- Sutherland, J., Varnam, A., 2002. Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia* *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. CW Blackburn, PJ McClure (Eds), Foodborne Pathogens. CRC press, p.384-415, Washington, DC.
- Şengöz, G., Yıldırım, F., Kart, K.Y., Şengöz, A., Nazlıcan, Ö. 2004. Stafilokok suşlarının fusidik asit ve çeşitli antibiyotiklere direnci, **ANKEM Dergisi**, 18(2): 105-8.
- Tang, Y.Z., Hoong Gin, K.Y., Lim, T.H. 2005. High temperature fluorescent *in situ* hybridization for detecting *Escherichia coli* in seawater samples, using rRNA-targeted oligonucleotide probes and flow cytometry. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(12): 8157-8164.
- Tatzel, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Wallnöfer, P.R. 1994. Identification of *Bacillus licheniformis* by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Syst. Appl. Microbiol.**, 17: 99-103.
- Tay, T.L., Ivanov, V., Kim, I.S., Feng, L., Tay J.H. 2001. Quantification of ratios of *Bacteria* and *Archaea* in methanogenic microbial community by fluorescence *in situ* hybridization and fluorescence spectrometry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 17(6): 583-589.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L. 1991. Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse (3rd Edn.) Metcalf and Eddy Inc., McGraw-Hill, New York, USA.

- Terranova, W., Cohen, M., Fraser, D., 1978. 1974 outbreak of 'Legionnaires' Disease diagnosed in 1977 Clinical and epidemiological features. **Lancet**, 1978: 122-124.
- Thacker, S.B., Bennet, J.V., Tsai, T. 1978. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by Legionnaires' disease bacterium. **J. Infect. Dis.**, 138: 512-519.
- Tortorello, M.L., Reineke, K.F. 2000. Direct enumeration of *Escherichia coli* and enteric bacteria in water, beverages and sprouts by 16S rRNA *in situ* hybridization. **Food Microbiol.**, 17: 305-313.
- Tunail, N., Halkman, A.K., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi II Ders Notları, Ank. Univ. Ziraat Fak., Gıda Müh. Bölümü, Ankara.
- Türk Toraks Derneği, 2009. Erişkinlerde toplumda gelişen pnömoni tanı ve tedavi uzlaşısı raporu. *Toraks Dergisi*; 10 (2).
- Ünlütürk, A., Turantaş, F. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, 1. Baskı, İzmir, 134-136.
- Van De Peer, Y., Robbrecht, E., De Hoog, S., Caers, A. P., De Rijk, De Wachter, R. 1999. Database on the structure of small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Res.**, 27(1): 179 - 183.
- Vieira-Pinto, M., Oliveira, M., Bernardo, F., Martins, C. 2007. Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent *in situ* hybridization: a comparison with VIDAS®-SLM system and ISO 6579 cultural method. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 59(6): 1388-1393.
- Vieira-Pinto, M., Oliveira, M., Aranha, J., Martins, C., Bernardo, F. 2008. Influence of an enrichment step on *Salmonella* sp. detection by fluorescent *in situ* hybridization on pork samples. **Food Control**, 19: 286-290.
- Waar, K., Degener, J.E., Luyn, M.J., Harmsen, H.J.M. 2005. Fluorescent *in situ* hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. **J. Med Microbiol.**, 54: 937-944.
- Wagner, M., Amann, R., 1997. Molecular techniques for determining microbial community structures in activated sludge. Iawq Scientific and Technical Report.
- Wagner, M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.H., Bubert, A., Goebel, W., Schleifer, K.H. 1998. *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. **Fems Microbiology Letters**. 160: 159-168.

- Wang, R.F., Cao, W.W., Johnson, M.G. 1991. Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 3666-3670.
- Wilks, S., Keevil, W.C. 2006. Targeting species-specific low-affinity 16SrRNA binding sites by using peptide nucleic acids for detection of *Legionellae* in biofilms. **Applied And Environmental Microbiology**, 72 (8): 5453-5462.
- Xu, K.M., Zhang, M., Eitzen Z.A., Ghan, S.J., Klein, S.A., Wu, X., Xie, S., Mranson, M., Del Genio, A.D., Iacobellis, S.F., Khairoutdinov, M.W., Lin, Ü., Löhmann, D.A., Randall, R.C.J., Somerville, Y.C., Sud, G.K., Walker, A., Wolf, J.J., Yio, and Zhang, J. 2005. Modeling springtime shallow frontal clouds with cloud-resolving and single-column models. **J. Geophys. Res.**, Vol 110.

**EKLER**

EK 1. Araştırma materyallerinin örnekleme tarihleri ve kullanılan kodların açıklamaları

EK 2. Floresan işaretli oligonökleotid problemlerin özellikleri

EK 1. Araştırma materyallerinin örnekleme tarihleri ve kullanılan kodların açıklamaları

Örnek Kodu	Açıklama	Örnekleme tarihi	Örneğin Alındığı Yer	Örnek Kodu	Açıklama	Örnekleme tarihi	Örneğin Alındığı Yer
PB2*	Piliç butu	17.12.2008	Halk pazarı	PP3*	Piliç butu	05.02.2009	Halk pazarı
PB3*	Piliç butu	17.12.2008	Halk pazarı	PP4*	Piliç butu	05.02.2009	Halk pazarı
PB4*	Piliç butu	17.12.2008	Halk pazarı	PP5*	Piliç butu	05.02.2009	Market
PB5*	Piliç butu	17.12.2008	Halk pazarı	PP6*	Piliç butu	05.02.2009	Market
PB6*	Piliç butu	25.12.2008	Halk pazarı	PP7*	Piliç butu	11.02.2009	Market
PB7*	Piliç butu	04.01.2009	Market	TC2*	Tavuk ciğeri	11.02.2009	Market
PB8*	Piliç butu	04.01.2009	Market	TC3*	Tavuk ciğeri	11.02.2009	Market
PB9*	Piliç butu	04.01.2009	Halk pazarı	TC4*	Tavuk ciğeri	15.02.2009	Market
PB10*	Piliç butu	04.01.2009	Halk pazarı	TC5*	Tavuk ciğeri	15.02.2009	Market
PB11*	Piliç butu	17.01.2009	Market	TC6*	Tavuk ciğeri	15.02.2009	Market
PB12*	Piliç butu	17.01.2009	Market	TC7*	Tavuk ciğeri	15.02.2009	Market
PB13*	Piliç butu	17.01.2009	Halk pazarı	TC8*	Tavuk ciğeri	15.02.2009	Halk pazarı
PB14*	Piliç butu	24.01.2009	Market	TC9*	Tavuk ciğeri	21.02.2009	Market

\*Sınır değerinin üzerinde *E.coli* içeren örnekler; Mavi: *Salmonella* spp. saptanan örnekler



Örnek Kodu	Açıklama	Örnekleme tarihi	Örneğin Alındığı Yer	Örnek Kodu	Açıklama	Örnekleme tarihi	Örneğin Alındığı Yer
PB15*	Piliç butu	28.01.2009	Halk pazarı	TC10*	Tavuk ciğeri	21.02.2009	Halk pazarı
PB16*	Piliç butu	28.01.2009	Market	TC11*	Tavuk ciğeri	21.02.2009	Halk pazarı
BPP2	Piliç butu	28.01.2009	Market	TPK3*	Tabakta piliç kanat	26.02.2009	Halk pazarı
BPP3	Piliç butu	05.02.2009	Halk pazarı	TPK1*	Tabakta piliç kanat	26.02.2009	Halk pazarı
TPK2*	Tabakta piliç kanat	26.02.2009	Halk pazarı	DK4*	Dana kıyma	17.12.2008	Halk pazarı
TPK3	Tabakta piliç kanat	05.03.2009	Halk pazarı	DK5*	Dana kıyma	25.12.2008	Market
TPK4*	Tabakta piliç kanat	05.03.2009	Halk pazarı	DK6*	Dana kıyma	04.01.2009	Market
TPK5*	Tabakta piliç kanat	05.03.2009	Halk pazarı	DK7*	Dana kıyma	04.01.2009	Market
TPK6*	Tabakta piliç kanat	12.03.2009	Halk pazarı	DK8*	Dana kıyma	04.01.2009	Market
TPK7*	Tabakta piliç kanat	12.03.2009	Halk pazarı	DK9	Dana kıyma	17.01.2009	Halk pazarı
TPK8*	Tabakta piliç kanat	12.03.2009	Market	DK10	Dana kıyma	17.01.2009	Halk pazarı
TPK9*	Tabakta piliç kanat	12.03.2009	Halk pazarı	DK11	Dana kıyma	17.01.2009	Halk pazarı
TPK10*	Tabakta piliç kanat	09.04.2009	Halk pazarı	DK12	Dana kıyma	24.01.2009	Halk pazarı
TPK11*	Tabakta piliç kanat	09.04.2009	Halk pazarı	DK13*	Dana kıyma	28.01.2009	Market

\*Sınır değerinin üzerinde *E.coli* içeren örnekler; Mavi: *Salmonella* spp. saptanan örnekler

Örnek Kodu	Açıklama	Örnekleme tarihi	Örneğin Alındığı Yer	Örnek Kodu	Açıklama	Örnekleme tarihi	Örneğin Alındığı Yer
TPK12*	Tabakta piliç kanat	09.09.2009	Market	DK14*	Dana kıyma	05.02.2009	Halk pazarı
TPK13	Tabakta piliç kanat	09.09.2009	Market	DK15*	Dana kıyma	05.02.2009	Halk pazarı
BPP4	Boyunsuz poşetli piliç	15.03.2010	Market	DK16*	Dana kıyma	05.02.2009	Market
BPP5	Boyunsuz poşetli piliç	15.03.2010	Market	DK17*	Dana kıyma	05.02.2009	Market
PP1	Poşetli piliç	15.03.2010	Halk pazarı	DK18*	Dana kıyma	05.02.2009	Market
PP2*	Poşetli piliç	15.03.2010	Halk pazarı	DK19*	Dana kıyma	11.02.2009	Halk pazarı
DK1*	Dana kıyma	17.12.2008	Market	DK20*	Dana kıyma	11.02.2009	Halk pazarı
DK2*	Dana kıyma	17.12.2008	Market	DK21*	Dana kıyma	11.02.2009	Halk pazarı
DK3*	Dana kıyma	17.12.2008	Market	DK22*	Dana kıyma	15.02.2009	Halk pazarı
DK23*	Dana kıyma	15.02.2009	Halk pazarı	DK37*	Dana kıyma	09.04.2009	Halk pazarı
DK24*	Dana kıyma	15.02.2009	Halk pazarı	DK38*	Dana kıyma	09.04.2009	Halk pazarı
DK25*	Dana kıyma	21.02.2009	Halk pazarı	DK39*	Dana kıyma	01.09.2009	Market
DK26	Dana kıyma	21.02.2009	Halk pazarı	DK40*	Dana kıyma	01.09.2009	Market
DK27*	Dana kıyma	21.02.2009	Halk pazarı	DK41*	Dana kıyma	01.09.2009	Market

\*Sınır değerinin üzerinde *E.coli* içeren örnekler; Mavi: *Salmonella* spp. saptanan örnekler

Örnek Kodu	Açıklama	Örnekleme tarihi	Örneğin Alındığı Yer	Örnek Kodu	Açıklama	Örnekleme tarihi	Örneğin Alındığı Yer
DK28*	Dana kıyma	26.02.2009	Market	DK42*	Dana kıyma	13.01.2010	Pazar
DK29	Dana kıyma	26.02.2009	Market	DK43*	Dana kıyma	13.01.2010	Pazar
DK30	Dana kıyma	26.02.2009	Market	DK44	Dana kıyma	13.01.2010	Halk pazarı
DK31	Dana kıyma	26.02.2009	Market	DK45*	Dana kıyma	13.01.2010	Halk pazarı
DK32	Dana kıyma	05.03.2009	Halk pazarı	DK46*	Dana kıyma	15.03.2010	Market
DK33*	Dana kıyma	05.03.2009	Halk pazarı	DK47*	Dana kıyma	15.03.2010	Market
DK34*	Dana kıyma	05.03.2009	Market	DK48*	Dana kıyma	15.03.2010	Market
DK35*	Dana kıyma	05.03.2009	Market	DK49*	Dana kıyma	15.03.2010	Market
DK36*	Dana kıyma	05.03.2009	Market	DK50*	Dana kıyma	15.03.2010	Market

\*Sınır değerinin üzerinde *E.coli* içeren örnekler; Mavi: *Salmonella* spp. saptanan örnekler

## EK 2. Floresans işaretli oligonükleotid problemlerin özellikleri

Oligo. Adı	Uzunluk (bp)	Kons.	M <sub>A</sub>	Tm	GC%	Hedef Bölge	Hedef	Referans	Sekans (5' → 3')
<b>EUB 338</b>	18	0.05	6061	64.4	%67	16SrRNA	Bacteria	Amann R. vd., 1990	FlcGCTGCCTCCCGTAGGAGT
<b>Non EUB</b>	18	0.05	6079	64.4	%67	-	Anlamsız prob	Neef A. vd., 1995	FlcACTCCTACGGGAGGCAGC
<b>ECO 1167</b>	18	0.05	6070	70.3	%67	23SrRNA	<i>E.coli</i>	Neef A. vd., 1995	FlcGCATAAGCGTCGCTGCCG
<b>LEG 705</b>	18	0.05	6002	60.7	%56	16SrRNA	<i>Legionella</i>	Manz W. vd., 1995	FlcCTGGTGTTCCCTCCGATC
<b>Sau</b>	19	0.05	6358	65.1	%58	16SrRNA	<i>S.aureus</i>	Kempf V.A. vd., 2000	FlcGAAGCAAGCTTCTCGTCCG
<b>Sal3</b>	19	0.05	5988	53.0	%44	16S rRNA	<i>Salmonella spp.</i>	Nordentoft vd., 1997	FlcAATCACTTCACCTACGTG

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burcu İşman Çokay  
Doğum Yeri ve Tarihi : Nazilli-14.08.1978

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : DEÜ Buca Eğitim Fak. Biyoloji Eğitimi ABD  
Yüksek Lisans Öğrenimi : ADÜ Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü  
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar

-SCI

İşman B., Bıyık H., 2009. The Aflatoxin Contamination of Fig Fruits in Aydın City (Turkey). Journal of Food Safety. 29(2): 318-330(13).

#### b) Bildiriler

-Ulusal

İşman, B., Aydın Yöresinde Yetiştirilen Kuru İncirlerde Aflatoksin Oluşturan Mikrofunguslar, 17. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adana, Poster, 28/06/2004.

İşman B., Aydın Yöresindeki Kuru İncirlerdeki Aflatoksin Kontaminasyonunun Belirlenmesi, 18. Ulusal Biyoloji Kongre Kitabı, 412, Kuşadası. Poster, 27/06/2006 .

Metin K., Başbülbul G., Ateşlier Z.B.B., İşman B., Poyrazoğlu E., Bıyık H.H., Oryaşın E., Menderes Nehri'ne deşarj edilen bazı fabrika arıtım tesislerinin çıkış sularının mevsime bağılı olarak mutajenitelerinin, AMES/Salmonella test sistemiyle belirlenmesi, 18.Ulusal Biyoloji Kongresi, Poster, 26/06/2006.

İşman, B., Poyrazoğlu, E., Pristas, P., Tothova, T., Bıyık, H.H., Ekstraselüler Polisakkarit Sentezleyen Bazı Bakterilerin 16S rDNA, IGS ve ERIC PCR Yöntemleri Kullanılarak İdentifikasyonu, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, ANTALYA, Poster, 29/10/2007 .

İşman, B., Şahiner, A., Poyrazoğlu, Ç.E., Bıyık, H. Tarihi Yapılarda Üreyen Funguslar Üzerine Dezenfektan Denemeleri, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Kuşadası, 2006.

Poyrazoğlu, Ç.E., İşman, B., Bıyık, H. *Coriolus versicolor'* dan Polisakkaropeptid (PSP) Eldesi ve PSP' nin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Kuşadası, 2006.

-Uluslararası

Babahan, İ. ,İşman, B., Bıyık, H., İzçankurtaran, T. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Pyridyl Hydrazones Derivatives Bearing vic-dioxime Groups and Their Metal Complexes, Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Budapeşte-Macaristan, Poster, 25/06/2009.

c) Katıldığı Projeler

Aydın Yöresinde Yetiştirilen Kuru İncirlerdeki Aflatoksin Üreten Fungus Florasına Ultraviyole Işıklarının Etkilerinin İncelenmesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu, FEF-03007, 2003. Y.L. Tezi.

Aydın İli Evsel Ve Endüstriyel Atık Sularının Mutajenik Etkilerinin AMES Testiyle Belirlenmesi ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri FEF-3012, Yardımcı Araştırmacı, 2006.

Doğal Kaynaklardan (karınca yumurtası, karınca toprağı ve normal toprak) Yoğurt Yapımı ve Yoğurt Yapımında Etkili Olan Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanısı TÜBİTAK BAYG (Öğrenci projesi), Proje Danışmanı, 2006.

FISH Ve Standart Mikrobiyolojik Yöntemlerle Gıda ve Sulardaki Önemli Bakterilerin Belirlenmesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu, FEF 05–1008. Doktora Tezi.

d) Atıflar

Hamanaka, D, Norimura, N., Baba, N., Mano, K., Kakiuchi, M., Tanaka, F., Uchino, T., 2011. Surface Decontamination of Fig Fruit by Combination of Infrared Radiation Heating with Ultraviyole İrradiation. Food Control, 22: 375-380.

**İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: ADÜ Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl.-Araştırma Görevlisi, 2002–2009.

:Safe Spice Gıda Sterilizasyon A.Ş. Laboratuvar Müdürü- Mikrobiyolog, 2009-devam ediyor.

**İLETİŞİM**

E-posta Adresi : [bisman@adu.edu.tr](mailto:bisman@adu.edu.tr); [b\\_isman@yahoo.com](mailto:b_isman@yahoo.com)  
Tarih : 10.04.2011