



**MODEL SÜT İŞLETMESİNDE KONTAMİNASYON
KAYNAĞININ BELİRLENMESİ AMACI İLE
YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME (HRM)
ANALİZİNİN KULLANIMI**

Funda TARAKÇIOĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Prof. Dr. Bülent ÇETİN
2019
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MODEL SÜT İŞLETMESİNDE KONTAMİNASYON KAYNAĞININ
BELİRLENMESİ AMACI İLE YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ
ERİME (HRM) ANALİZİNİN KULLANIMI**

Funda TARAKÇIOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2019**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**MODEL SÜT İŞLETMESİNDE KONTAMİNASYON KAYNAKLARININ
BELİRLENMESİNDE YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME (HRM)
ANALİZİNİN KULLANIMI**

Prof. Dr. Bülent ÇETİN danışmanlığında, Funda TARAKÇIOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma ..05../08../2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (3./3.) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mustafa SENGÜL

İmza : M. Sengül

Üye : Prof. Dr. Bülent ÇETİN

İmza : B. Çetin

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yunus Emre TUNÇİL

İmza : Y. E. Tunçil

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu ..23../08../2019.. tarih ve ..33../.../72..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Mehmet Karakan

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN Y.
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MODEL SÜT İŞLETMESİNDE KONTAMİNASYON KAYNAKLARININ BELİRLENMESİ AMACI İLE YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME (HRM) ANALİZİNİN KULLANIMI

Funda TARAKÇIOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Ürün ve işletmelerde kontaminasyon kaynağının belirlenmesi gıda güvenliği açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla, çalışmada piyasa ve işletme kaynaklı *E. coli* izolasyonunda bulunularak klasik ve moleküler yöntemlerle kontaminasyon kaynağı belirlenmeye çalışılmıştır. Denemede 22 piyasa örneğinden 77 koliform izolatı elde edilmiş olup, 38'i (%49) *E. coli* olarak belirlenmiştir. Süt işletmesinden elde edilen 25 numunede ise 45 izolattan 21'i (%47) *E. coli* suşu olarak tespit edilmiştir. İlgili izolatların benzerlikleri öncelikle morfolojik, kültürel ve IMViC sonuçları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. *E. coli* olduğu tespit edilen suşlarda spesifik HRM sıcaklığı belirlenmesi ve ScreenClust programı ile Principal Component Analysis (PCA) yapılmıştır. Deney sonucunda elde edilen *E. coli* izolatları için geleneksel metotlarla iki, spesifik HRM sıcaklığı belirlenmesi ile beş ve PCA ile sekiz farklı izolat gruplandırması yapılabilmektedir. İşletme numunelerine uygulanan PCA sonucunda elde edilen dört farklı grup içerisinde de çiğ süt kaynaklı izolatların varlığı, işletmede hammaddenin önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak HRM analizinin kontaminasyon kaynağının belirlenmesinde kullanılabileceği ortaya koyulmuş olup optimizasyon çalışmalarıyla sensitivite ve spesifitenin artırılabilmesi belirlenmiştir.

2019, 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: kontaminasyon, *E. coli*, Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Yüksek Çözünürlüklü Erime, Temel Bileşen Analizi

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF CONTAMINATION SOURCES IN MODEL DAIRY PLANT BY HIGH RESOLUTION MELTING (HRM)

Funda TARAKÇIOĞLU

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

Supervisor: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Determining the sources of any type of-contamination in products and factories is an important for food safety. Here, it was aimed to determine the sources of microbial contamination classical and molecular methods by isolating *Escherichia coli* in various food products collected from the market and factory. For this purpose, 77 coliform isolates were obtained from 22 market samples and 38 of them were identified as *E. coli*. In 25 samples collected from a dairy factory, 45 isolates were obtained and 21 of which were identified as *E. coli* strains. The similarities of the isolates were primarily determined by considering morphological, cultural and IMVIC results. Specific HRM temperatures were determined in *E. coli* strains and Principal Component Analysis (PCA) was performed with ScreenClust program. *E. coli* strains isolated from market samples were divided into two groups by conventional methods, five by specific HRM temperatures and eight by PCA. In the factory samples, the presence of raw milk isolates in the four different groups obtained by PCA results shows that the raw material is an important source of contamination. As a result, it has been shown that HRM analysis can be used to determine the source of contamination and it has been determined that sensitivity and specificity of the method can be increased by optimization studies.

2019, 81 pages

Keywords: contamination, *E. coli*, Real Time-PCR, HRM (High Resolution Melting), PCA (Principal Component Analysis)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm safhalarında her türlü yardımda bulunarak beni yönlendiren, üstün bilgi ve tecrübesinden her daim faydalandığım saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımda bulunan Arş. Gör. Hacer MERAL'e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca beni teşvik ederek maddi manevi desteklerini üzerimden esirgemeyen değerli babama ve ağabeylerime, çalışmalarım sırasında yanımda bulunarak bana yardımcı olan biricik kardeşim Yağmur TARAKÇIOĞLU'na özellikle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı ömrü elverdiğince ilgisini, sevgisini tatma şansına sahip olduğum, her koşulda yanımda olan ve varlığından her daim gurur duyduğum kıymetli annem **Saime TARAKÇIOĞLU**'na ithaf ediyorum.

Funda TARAKÇIOĞLU

Temmuz, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Dilüsyonların hazırlanması.....	27
3.2.2. Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı	28
3.2.3. Maya-küf sayımı.....	28
3.2.4. <i>S. aureus</i> sayımı	28
3.2.5. Koliform grubu bakterilerin sayımı ve muhtemel <i>E. coli</i> suşlarının izolasyonu	29
3.2.5.a. Gram boyama	30
3.2.5.b. Katalaz testi	31
3.2.5.c. Oksidaz testi	31
3.2.5.d. IMViC testi.....	32
3.2.6. <i>E. coli</i> izolatlarının HRM analizi	37
3.2.6.a. DNA izolasyonu	37
3.2.6.b. Real-Time PCR HRM ile genotiplendirme	39
3.2.7. İstatistiksel analizler	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	41
4.1. Mikrobiyolojik Bulgular.....	41
4.2. <i>E. coli</i> Suşlarının Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	51
4.3. PCA ve HRM Analiz Bulguları.....	57

5. SONUÇ	71
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	82



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

g	Gram
kob	Koloni oluşturan birim
log	Logaritma
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre

Kısaltmalar

BPA	Baird Parker Agar
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleosit Trifosfat
dsDNA	Çift iplikçikli DNA molekülü
EMB	Eosin Methylene Blue
HRM	Yüksek Çözünürlüklü Erime (High Resolution Melting)
LB	Luria Bertani Sıvı Besiyeri
PCA	Plate Count Agar
PCA	Principal Component Analysis
PDA	Potato Dextrose Agar
RT-PCR	Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphisms)
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
TE	Tris-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı (Temperature melting)
VRB	Violet Red Bile
WHO	World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aşamaları	13
Şekil 1.2. Örnek bir HRM kütresi; <i>L. casei</i> (1), <i>L. casei-E. coli</i> (2) karışımı ve <i>E. coli</i> (3)	15
Şekil 1.3. 16S rRNA geninin <i>E. coli</i> için yüksek değışkenlik gösteren bölgeleri	16
Şekil 3.1. VRB agarda gelişen koliform grubu bakterilerin görünümü	29
Şekil 3.2. EMB agara çizimi gerçekleştirilen <i>E. coli</i> bakterileri (sol) ve -80°C'den Nutrient agarda geliştirilen saf kültür izolatu (sağ)	30
Şekil 3.3. Katalaz pozitif reaksiyon sonucu	31
Şekil 3.4. 5 nolu izolata ait oksidaz pozitif reaksiyon sonucu	32
Şekil 3.5. Triptofandan indol oluşum reaksiyonu	33
Şekil 3.6. İndol negatif (sol) ve indol pozitif (sağ) test sonucu	34
Şekil 3.7. Glikozdan fermentasyonla organik asit oluşumu reaksiyonu	34
Şekil 3.8. 75 nolu izolata ait Metil Kırmızısı pozitif test sonucu	35
Şekil 3.9. 1F3 kodlu izolata ait VP pozitif test sonucu	36
Şekil 3.10. İzolatlara ait sitrat negatif (sol) ve sitrat pozitif (sağ) test sonucu	37
Şekil 4.1. V1 bölgesi için denemede kullanılan suşlara ait RT-PCR sonuçları (sol) ve HRM eğrileri (sağ)	58
Şekil 4.2. V1 bölgesi için ön denemede kullanılan suşların HRM eğrisinin türevi	59
Şekil 4.3. V3 bölgesi için denemede kullanılan suşlara ait PCR sonuçları (sol) ve HRM eğrisi (sağ)	59
Şekil 4.4. V3 bölgesi için denemede kullanılan suşların HRM eğrisinin türevi	60
Şekil 4.5. Belirlenen 5 farklı <i>E. coli</i> suşunu temsil eden izolatların HRM türev sonucu	61
Şekil 4.6. Tespit edilen farklı suşların temsili örneklerine ait spesifik sıcaklık değerleri	61
Şekil 4.7. ScreenClust programının PCA işlemi öncesi boyut ve küme sayısını öneren Fark İstatistik grafiğı	64
Şekil 4.8. Piyasa örneklerine ait <i>E. coli</i> suşlarının PCA (Principal Component Analysis) sonucu	65

Şekil 4.9. Fabrika örneklerinden izole edilen <i>E. coli</i> suşlarının PCA sonucuna ait suş numaraları.....	67
---	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Amerika’da gıda kaynaklı hastalığın görülmesine neden olan etkenler	2
Çizelge 1.2. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği süt ve süt ürünlerinde <i>E. coli</i> için gıda güvenilirliği kriterleri	6
Çizelge 1.3. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği Üretim Hijyeni Kriterleri’ne göre süt ve süt ürünlerinde için <i>E. coli</i> ’nin kabul edilebilir üst limitleri.....	6
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan işletme numuneleri ve kaynakları	26
Çizelge 3.2. Koliform grubu bakterilerin ^a IMViC reaksiyonları	33
Çizelge 4.1. Piyasa Beyaz peynir örneklerine ait mikrobiyolojik sayım sonuçları	41
Çizelge 4.2. Aynı süt işleme tesisine ait numunelerin mikrobiyolojik sayım sonuçları.....	44
Çizelge 4.3. Piyasa örneklerine ait izolatların kaynağı ve izolat kodları.....	48
Çizelge 4.4. Aynı süt işletmesinden alınan örneklerle ait izolatların kaynağı ve izolat kodları	49
Çizelge 4.5. Piyasa peynirlerinden izole edilen koliform bakterilerin bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	51
Çizelge 4.6. Fabrika numunelerinden izole edilen koliform bakterilerin bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	54
Çizelge 4.7. Piyasadan elde edilen <i>E. coli</i> suşlarının spesifik erime sıcaklıklarına göre gruplandırılması	62
Çizelge 4.8. ScreenClust programı kullanılarak piyasa suşlarının tiplendirilmesi	63

1. GİRİŞ

Gıda; insanın büyümesi, gelişebilmesi ve hayatını devam ettirmesi için ihtiyacı olan enerji, vitamin, mineral gibi elzem maddeleri karşılamasının yanında, içerdiği mikroorganizmalar nedeni ile sağlığı olumlu yönde etkileyen en önemli unsurlardan birisidir. Bu sebeple tüketilen gıdaların güvenilirliği sağlıklı yaşamın gelişimi ve sürdürülebilirliği açısından önem arz etmektedir. Güvenilir gıda, hammadde temini ile başlayan üretim aşamasından, tüketime uzanan zincir boyunca içeriğinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik riskleri barındırmayan, dolayısı ile sağlık açısından sakınca oluşturmayacak şekilde tüketime hazır hale getirilmiş, besin değerini koruyan gıdalar olarak tanımlanabilmektedir (Erkmen 2010). Güvenilir gıda üretiminde ise üretim hattı boyunca kritik kontrol noktalarının belirlenerek takibi ve düzeltici önlemlerin hayata geçirilmesi özel öneme sahiptir (Ray and Bhunia 2013; Walls *et al.* 2019).

Toplumsal her kesimi gıdaların taşıyabileceği riskler açısından benzer hassasiyete sahip değildir. Güvenilir olmayan gıda tüketimi sonucu özellikle bağışıklık sistemi, sağlıklı yetişkin bireylere nispeten zayıf olan yenidoğanlar, çocuklar, hastalar ve yaşlılarda oluşabilecek gıda kaynaklı hastalıklardan dolayı daha fazla tahribata uğradıkları bilinmektedir. Bu kapsamda gıdanın üretimi, işlenmesi, ambalajlanması, depolanması, muhafazası ve tüketiciye ulaşmak üzere satışı aşamalarında rol alan ilgili kişilerin de gerekli hijyen ve optimum ortam koşullarının sağlanması adına GMP (Good Manufacturing Practices) ilkelerine uygun şekilde hareket etme hassasiyetine ve bilincine sahip olmalıdırlar. Ürünü satın alan tüketici için de bu zincir devam etmekte olup, gıdaya uygun pişirme sıcaklığı ve normunun uygulanması, gıdanın güvenli sıcaklıklarda muhafazası ve çapraz kontaminasyona mahal vermeyecek şartların sağlanması gibi hususlara dikkat edilerek, gıdanın zararlı hale dönüşmesi engellenip tüketim anına dek güvenilir kalması sağlanabilmektedir. Günümüzde yeterli bilincin sağlanamamasından ötürü açıkta satılan etiketsiz ürünler de talep görmeye devam etmektedir. Bu gıdalar, alt yapı yetersizliği ve çevre koşulları olumsuz bölgelerde insan sağlığını tehdit etmektedir (Aureli *et al.* 2000).

Amerika ve Avrupa da ki gelişmiş ülkelerde dahi *Escherichia coli* salgınlarının neden olduğu sağlık sorunları ve ekonomik kayıplar konunun önemini ortaya koymaktadır. Örneğin 1996'da Japonya'da ve 2000 yılında Kanada'da bildirilmiş olan *E. coli* kaynaklı salgınlarda 9000'den fazla kişi hastalanmış ve Japonya'da 12 kişi, Kanada'da ise 7 kişinin ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Anonim 2017a; Wei *et al.* 2019). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerin sebep olduğu hastalıklar dünya çapında önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Zhang *et al.* 2018). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, her yıl yaklaşık 1,5 milyon insan içme suyu ve gıdalarda bulunan patojenlerin neden olduğu hastalıklardan dolayı hayatlarını kaybetmektedir (WHO 2008). Yine 53 kişinin ölümü ile sonuçlanan Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) salgını da çok sayıda vakanın bildirildiği Kuzey Amerika ve Avrupa'da ki büyük çaplı gıda salgınlardan biridir. Almanya'da 2011 yılında gerçekleşen *E. coli* salgını, AB'ye üye 22 ülkede acil yardım harcamalarına 236 milyon dolar, çiftçiler ve endüstri için ise 1,3 milyar dolarlık bir zarara sebep olmuştur (Anonim 2017b). Amerika da her yıl 2 milyondan fazla gıda kaynaklı hastalığın görülmesine neden olan etkenler ve oranları Çizelge 1.1'de verilmiştir (Anonim 2011).

Çizelge 1.1. Amerika'da gıda kaynaklı hastalığın görülmesine neden olan etkenler (Anonim 2011)

Hastalığın Oluşmasında Etken Faktör	Hastalık Oluşumuna Etki Oranı
Uygun Olmayan Depolama Şartları	%37
Kişisel Hijyen Yetersizliği	%22
Yetersiz Pişirme	%17
Gıda İşleme Ekipmanlarının Kontaminasyonu	%10
Gıdanın Güvenilir Olmayan Kaynaktan Elde Edilmesi	%7
Diğer	%7

Protein içeriği yüksek et, yumurta, süt ve süt ürünleri gibi gıdalar hastalık etmeni mikroorganizmaların gelişimi açısından riskli gruptadır. Süt ürünleri içerisinde en çok çeşitliliğe sahip olan ve tüketimde en fazla yer alan gıdalardan biri Beyaz peynirdir

(Hayaloğlu vd 2002). Ülkemizde yöresel ve endüstriyel ölçekte üretilen birçok peynir çeşidi tüketilmektedir. Hammaddenin sadece süt olmasına karşın bu kadar fazla peynir üretilmesinin sebebi; sütün türü, işlenme yöntemi, yağ içeriği, kullanılan maya çeşidi, pıhtıyı işleme şekli, olgunlaşma süreci ve koşulları, tuzlama biçimi gibi üretim teknolojilerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Cebeci 2013). Beyaz peynir bileşimi itibari ile yeterli ve dengeli beslenmede önemli rol almakta aynı zamanda mikroorganizmaların gelişimi için de uygun bir besin ortamı sunmaktadır. Özellikle çiğ sütten üretilen peynirlerde çiğ sütün kalitesi ve standardizasyonu, üretim yöntemleri, hijyen kuralları gibi faktörler peynir kalitesini ve tüketici sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir. Bir gıdanın sağlığa zararlı olup olmadığının belirlenmesinde indikatör mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Bu amaçla koliform, *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae, *Enterococcus* ve *Bacillus* gibi mikroorganizma grup, cins ve türleri farklı ulusal veya uluslararası kurumlar tarafından kontaminasyon kaynağının belirlenmesinde kullanımı tavsiye edilmektedir. İlgili mikroorganizmaların tespitinde kültürel ve moleküler temelli birçok metot kullanılabilmektedir (Harrigan 1998).

Koliformlar, Enterobacteriaceae familyasında bulunan gram negatif, fakültatif anaerob, sporsuz, 35°C’de 48 saat içinde laktozu asit ve gaza fermente edebilen, Eosin Methylen-Blue (EMB) ve Endo agarda tipik gelişme gösteren bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan koliformlar; *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* ve *Klebsiella* cinsleri içinde yer almaktadır. Koliform grubu bakterilerin başlıca habitatları insan ve hayvanların bağırsağı olmakla beraber, toprak ve bitkilerde de bulunabilmektedirler. Bağırsak kökenli koliformlardan en önemlisi *Escherichia coli* olup, gıdalarda *E. coli* bulunması fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Ünlütürk and Turantaş 1998; Çetin 2013).

İlk olarak 1885 yılında Theodore Escherich tarafından tanımlanan *Escherichia coli* gram negatif, fakültatif anaerob, kısa çubuk şeklinde sporsuz bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 35-37°C olan *E. coli* 4-45°C gibi geniş sıcaklık aralıklarında da gelişebilmektedir. Bazı suşları peritrik flagellaları ile hareketlidir. Besin isteği açısından seçici olmayan *E. coli* basit karbonhidratların bulunduğu her besi ortamında

gelişebilmektedir. pH 5-9 arasında gelişebilen bu bakteri pH 2 gibi düşük değerlere kısa süreli maruz kalması durumunda da canlılığını koruyabilmektedir. Bu özelliği ile asidik mide ortamından geçerek bağırsakta kolonize olabilmektedir. *E. coli* biyotip-I tüm suşların %95'ini oluşturmakta ve indol, metil testlerinde pozitif; Voges-Proskauer, sitrat testlerinde ise negatif sonuç vermektedir. Biyotip-II ise indol negatiftir. Serolojik olarak tiplendirme yapılırken somatik (O), kapsüler (K veya V) ve flagella (H) antijenleri dikkate alınmaktadır (Ray and Bhunia 2013; Zorba 2013; Baker *et al.* 2016).

1950'li yılların sonuna kadar patojen olduğu bilinmeyen *E. coli*'nin bazı suşları patojen özellik gösterebilmekte ve diyare başta olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir. Patojen *E. coli* türlerinin enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroinvazif *E. coli* (EIEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroagregatif *E. coli* (EAggEC) ve diffuz-adhering *E. coli* (DAEC) olmak üzere en az altı patotip grubu vardır. İnsanlarda gastroenterite sebep olan EHEC tipleri içerisinde O157:H7 serotipi en önemlisi olup, ölümle sonuçlanan enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Çiftlik hayvanlarından genellikle süt sığırlarının taşıyıcısı olduğu bu serotipin 10-100 hücre arasında alınması enfeksiyon için yeterlidir. *Shigella* benzeri toksin üreten bu serotip verotoksijenik *E. coli* veya Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) olarak da adlandırılmakta ve ürettiği toksinlerle sindirim sistemine ciddi zararlar vermektedir. *E. coli* O157:H7'nin sebep olduğu en önemli enfeksiyonlar; hemolitik üremik sendrom (HUS), trombotik trombositopenik purpura (TTP) ve hemorajik kolittir (kanamalı kalın bağırsak iltihabı). Hemolitik üremik sendrom çocuk, yaşlı ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde böbrek yetmezliği ve böbrek fonksiyonlarının kalıcı olarak kaybına sebep olabilmektedir. Ölüm oranı %3-5 arasında değişmekte ve böbrek yetmezliğine ilaveten merkezi sinir sisteminde bozukluklar veya hipertansiyon görülebilmektedir. Sinir sistemi ile ilgili olan TTP beyinde kan pıhtılaşmasından meydana gelmekte ve sık sık ölümle sonuçlanmaktadır. Hemorajik kolit ise şiddetli kanlı ishal olarak bilinmekte ve tüm yaş gruplarında görülmesine rağmen bebek ve yaşlılarda ölüme yol açabilmektedir (Arıcan 2008; Ray and Bhunia 2013; Zorba 2013; Miszczycha *et al.* 2014; Liu *et al.* 2019).

Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklara yol açan patojenler içerisinde *E. coli* ilk sırada yer almaktadır. Bu patojen özellikle sığırlarda herhangi bir belirti göstermeden bulunabilmekte ve bu hayvanların dışkısı aracılığı ile toprak ve suya buradan da meyve sebzelere kolaylıkla bulaşabilmektedir. Ayrıca sağım esnasında süte, kesim esnasında ete bulaşabilen *E. coli*, çiğ veya yeterince pişirilmemiş et ve et ürünleri, çiğ süt ve süt ürünlerinde bulunarak salgınlara yol açabilmektedir (Zorba 2013; Arslan and Özdemir 2013).

E. coli O157:H7 kaynaklı salgınlar, çiğ ve pastörize süt ile bunların ürünleri de dahil olmak üzere çok çeşitli gıda ile ilişkilendirilmiştir. Bunların arasında çiğ süttten yapılan peynirlerin en sık kontamine olan ürün olduğu bilinmekte ve kısa olgunlaştırma süresine sahip olan (60 günden daha az) peynirlerin ciddi salgınlara yol açabileceği ifade edilmektedir (Guzman-Hernandez *et al.* 2016; Ioanna *et al.* 2018).

Dünyada gıdalarda bulunabilecek patojenler için üst sınır değerler yönetmelik veya tebliğler ile belirlenmiştir (Turan 2012). Ülkemizde ise Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği bu sınırları belirlemektedir. İlgili yönetmelik Gıda Güvenliği Kriterleri ve Üretim Hijyen Kriterleri olmak üzere iki başlıktan oluşmaktadır. Yönetmeliğe göre süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek *E. coli*'nin gıda güvenilirliği kriterleri ve kabul edilebilir üst sınır değerleri sırasıyla Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'te görülmektedir.

Çizelge 1.2. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği süt ve süt ürünlerinde *E. coli* için gıda güvenilirliği kriterleri

Gıda Grubu	Mikroorganizma	Gıda Çeşidi	Numune Alma Planı		Limitler	
			n	c	m	M
Süt ve süt ürünleri	<i>E. coli</i> *	Fermente süt ürünleri (kefir, yoğurt, meyveli vb. yoğurtlar, ayran vb.)	5	0	<3	
	<i>E. coli</i> *	Koyulaştırılmış süt	5	0	<3	
	Koliform**	Peynirler	5	1	9	95
	<i>E. coli</i> **		5	0	<10 ¹	

n: Numune sayısı.

c: m ile M limiti arasında değere sahip olmasına izin verilen numune sayısı.

m: (n – c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değer.

M: c sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değer.

*EMS tablosuna göre (/g)

**kob/g

Çizelge 1.3. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği Üretim Hijyeni Kriterleri'ne göre süt ve süt ürünlerinde için *E. coli*'nin kabul edilebilir üst limitleri

Gıda Grubu	Mikroorganizma	Gıda Çeşidi	Numune Alma Planı		Limitler	
			n	C	m	M
Süt ve süt ürünleri	<i>E. coli</i> *	Isıl işlem uygulanmış süt veya peynir altı suyundan üretilen peynirler	5	2	100	100
	<i>E. coli</i> *	Çiğ süt veya pastörizasyondan daha düşük sıcaklıklarda ısıtılmış işlem uygulanmış süttten üretilen tereyağı ve krema	5	0	10	100

n: Numune sayısı.

c: m ile M limiti arasında değere sahip olmasına izin verilen numune sayısı.

m: (n – c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değer.

M: c sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değer.

*kob/g

Gıdalarda bulunan mikroorganizmaların geleneksel yöntemlerle tespiti uzun zamandır kullanılmakta ve bu yöntemler doğrudan mikroskopik sayım ve kültürel sayım metotları olarak ikiye ayrılmaktadır. Kültürel sayım metotlarında mikroorganizmaların gelişip çoğalmalarına olanak sağlayacak besiyerleri kullanılmaktadır. Membran filtrasyon, en muhtemel sayı (EMS) ve katı besiyeri kullanılan kültür metotları ise gıdalarda bulunan mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılan nicel yöntemlerdir. Membran filtrasyon yönteminde örnekler genellikle 0,2 µm gözenek çapındaki filtreden geçirilmekte ve bu membranlar uygun besiyerine koyularak inkübe edildikten sonra sayım yapılmaktadır.

Katı besiyerinin kullanıldığı kültür yöntemlerinden en önemlileri yayma plak ve dökme plak metotlarıdır. Bu yöntemlerde besiyerinde gelişen koloniler çıplak gözle sayılmakta ve sonuçlar gram veya mililitredeki koloni oluşturan birim (kob/g-mL) olarak verilmektedir.

EMS ise genellikle mikroorganizma sayısının düşük olmasının beklendiği örneklerle uygulanan bir yöntem olup, ardışık üç dilüsyondan üçer veya beşer adet sıvı besiyeri bulunan tüpe ekim yapılarak inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda bulanıklık gözlemlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmekte, mikroorganizma sayıları ise istatistiksel yöntemlerle elde edilen çizelgeler kullanılarak hesaplanmaktadır (Harrigan 1998).

Mikroorganizmaların var/yok analizinde kullanılan yöntemler ise nicel yöntemler olarak adlandırılmaktadır. Ön zenginleştirme ve/veya seçici zenginleştirmenin kullanıldığı bu metotlar ekim ve doğrulama basamaklarının da dahil edilmesi ile 5-7 gün arasında sonuç verebilmektedir (Pichhardt 2004).

Geleneksel mikrobiyolojik analiz yöntemleri gıdalarda bulunan patojenlerin tespitinde ve sayımında güvenilir sonuçlar vermekte fakat uzun zaman ve yoğun iş yükü gerektirmektedir. Bu yöntemlerin diğer bir dezavantajı ise canlı fakat besiyerinde

gelişemeyen (viable but non culturable; VBNC) mikroorganizmaların tespit edilememesidir (Torun 2011; Turgay 2013; Hu *et al.* 2018; Priyanka *et al.* 2016).

İnsanlarda hastalık hatta ölümlere sebep olabilen gıda kaynaklı patojenlerin hızlı tespiti ve güvenilir gıda üretimine olan ilgi her geçen gün artmaktadır. İmmunoloji, moleküler biyoloji, otomasyon ve bilgisayar teknolojilerinde yaşanan gelişmeler, gıdalarda bulunabilen mikroorganizmaların tespitinde hızlı, hassas ve daha pratik yöntemlerin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur (Mandal *et al.* 2011). Gıda kaynaklı patojenlerin belirlenmesinde kullanılan hızlı mikrobiyolojik analiz yöntemlerinden bazılarına aşağıda kısaca yer verilmiştir.

ATP Biyolüminesans yöntemi, canlı hücrelerde bulunan adenosin trifosfat (ATP)'ın belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Ateş böceklerinde bulunan lusiferin ATP varlığında lusiferaz enzimi ile tepkimeye girdiğinde ışık yayılmasına sebep olmaktadır. Ortaya çıkan ışık miktarı ortamdaki ATP ile doğru orantılıdır ve ışık ölçüm cihazları kullanılarak belirlenebilmektedir. Biyolüminesans kullanılarak 10^4 kob/mL hücre (minimum eşik değeri) 5-10 dakika gibi kısa bir sürede belirlenebilirken, hem gıda bileşenleri hem de mikroorganizmalarda ATP bulunması yöntemin gıdalarda uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır. Bu yöntem daha çok üretim alanlarındaki malzemelerin yüzey temizliğinin kontrolünde kullanılmaktadır (Torun 2011; Ekinci and Sofu 2013).

İmmunolojik yöntemler, spesifik antijen-antikor etkileşimine bağlı yöntemler olarak tanımlanmaktadır. Gıda kaynaklı patojenlerin belirlenmesinde en çok kullanılan immünolojik yöntem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)'dır. ELISA antijen veya antikora bir enzimin bağlanmasıyla renkte meydana gelen değişimlerin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Sandviç ELISA ise iki antikorun kullanıldığı en etkin ELISA yöntemidir. Bu yöntemde genellikle birinci antikor mikropate kuyucukları üzerinde immobilize edilir. Hedef antijen (patojen veya toksin) kuyucuklara ilave edilerek primer antikora bağlanması için bir süre beklendikten sonra bağlanmamış antijenler yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra enzim bağlı

ikinci antikor eklenmekte ve antijen iki antikor arasına sıkışmaktadır. Antijene bağlanmamış ikincil antikorlar ise yıkanarak uzaklaştırılmaktadır. Son aşamada enzime spesifik substrat eklenmekte ve reaksiyon sonucu oluşan renkten patojen tayini yapılabilmektedir. ELISA’da kullanılan farklı enzimler olmakla birlikte horseradish (yaban turpu) peroksidaz (HRP), alkalın fosfataz ve beta-galaktosidaz en çok kullanılanlardır (Law *et al.* 2015; Priyanka *et al.* 2016).

Biyosensörler, hedef biyolojik sinyali algılayan bir biyoreseptör ve elde edilen sinyalleri elektrik enerjisine dönüştürebilen bir transducerden (dönüştürücü) oluşmaktadır. Biyoreseptör tarafından tanımlanacak analitler;

- a. Biyolojik materyaller; enzim, antikor, nükleik asit
- b. Biyolojik olarak türetilmiş malzemeler; aptamerler, rekombinant antikorlar
- c. Biyomimetik malzemeler; baskılı polimerler ve sentetik katalizörler

olarak sınıflandırılmakta ve mutlaka biyolojik bir materyal olması gerekmektedir. Gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde genellikle optik, elektrokimyasal ve kütle bazlı biyosensörler kullanılmaktadır. Biyosensörlerin en büyük avantajı, patojenleri düşük tespit limitlerinde yüksek özgüllük ve hassasiyetle saptayabilmeleridir. Ancak biyosensörler doğru sonuçlar verebilmek için uyumlu bilgisayar yazılımı ile oldukça spesifik ve pahalı cihazlar gerektirmektedir (Ekinci and Sofu 2013; Law *et al.* 2015; Priyanka *et al.* 2016).

Moleküler metotlar arasında yer alan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), belirli DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan *in vitro* bir metottur. Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için ortamda kalıp DNA, nükleotid karışımı (dNTP), kalıp DNA’daki hedef bölgeye spesifik primerler, DNA polimeraz enzimi, enzime uygun tampon çözelti ve katalizör olarak rol alan $MgCl_2$ bulunması gerekmektedir. PCR’ın ilk aşaması olan denatürasyonda sıcaklık 94-96°C’ye yükseltilmekte ve çift zincirli olan DNA molekülü, yapısındaki hidrojen bağlarının açılması ile tek zincirli hale dönüşmektedir. Erime sıcaklığı çift zincirli

DNA molekülünün yarısının tek zincirli forma dönüştüğü sıcaklık olarak tanımlanmaktadır. Reaksiyonun ikinci aşaması olan bağlanmada (annealing) sıcaklık 45-60°C'ye düşürülmekte ve bu esnada primerler kalıp DNA'daki hedef bölgeye tutunmaktadır. Reaksiyonun üçüncü ve son aşaması olan uzamada (elongasyon) ise sıcaklık DNA polimeraz enziminin çalışabildiği optimum değer olan 72°C'ye çıkarılmakta ve tek zincirli DNA molekülüne bağlanan primerlerden itibaren kopyalama işlemi gerçekleştirilmektedir. DNA polimeraz enzimi sıcaklığa (96°C) dayanıklı olup, DNA'nın 5' ucundan 3' ucuna doğru dNTP'leri ekleyerek hedef bölgeyi çoğaltmakta böylece bir döngü tamamlanmaktadır (Şekil 1.1). Yeni oluşan her DNA çift sarmalı bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu işlem 20-40 kez tekrar edilir. Çevrimler sonunda 2^n (n: döngü sayısı) sayıda DNA kopyası elde edilmektedir. Klasik PCR metotlarında PCR ürünleri jel veya kapiler elektroforez kullanılarak DNA marker ile birlikte yürütülmekte ve ultraviyole ışığı altında görüntülenerek uzunlukları belirlenmektedir (Anonymous 2007; Ekinci and Sofu 2013; Elkins *et al.* 2016; Bilginer 2018).

Moleküler esaslı tiplendirme yöntemlerinden Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) metodunun temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş primerin düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR işlemi ile amplifikasyonunun yapılmasıdır. Tekniğin devamında ise elde edilen ürün standart jel elektroforezinde yürütülür ve bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların sayısı ve çeşitliliğe göre sonuçlar değerlendirilir (Trcek *et al.* 1997; Kıran ve Ağaoğlu 2011).

Rep-PCR çoğu bakterinin genomunda birçok kopyasının doğal olarak bulunduğu, oldukça korunmuş ve tekrarlanan DNA sekanslarının amplifikasyonu üzerine kurulmuş bir genomik parmakizi tekniğidir. Bugüne kadar tekrarlanan DNA sekanslarının 3 türü tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi; tekrarlanan ekstrasjenik palindromik (REP) olarak adlandırılan 35-40 baz çifti büyüklüğünde ve çeşitli halkaları yapısında bulunduran elementlerdir. Enterobakteriyal tekrarlanan interjenik palindromik konsensus (ERIC) ise; 124-127 baz çifti büyüklüğünde ve merkezi

korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Son olarak BOX dizisi ise 154 baz çiftlik BOX A, BOX B, ve BOX C şeklinde isimlendirilmiş korunmuş alt ünitelere sahip elementlerdir (Redondo *et al.* 2009; Kıran ve Ağaoğlu 2011; Vegas *et al.* 2013).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yönteminde kromozomal DNA izole edilmekte, genellikle PCR işlemi yapılmakta ve restriksiyon enzimiyle muamele edildikten sonra oluşan fragmentlerin agaroz jelde ayrımı gerçekleştirilmektedir. Gen ürünleri olan proteinler, genin farklı allelik yönlerini yansıttığı için bu türden polimorfizmlerin tespit edilmesi, tür içi ya da türler arası varyasyonu moleküler düzeyde tanımlamak açısından önemlidir. Kısaca RFLP analizinde restriksiyon enzimlerinin DNA'daki kesim noktalarındaki farklılıklardan faydalanılmaktadır. Bantlar ve bantlar arasındaki farklılıklar karşılaştırılarak her izolatin ayrımı sağlanmaktadır (Gonzalez *et al.* 2006; Gullo *et al.* 2006; Kıran ve Ağaoğlu 2011; Ata 2012; Karacan 2013; Çetin vd 2017).

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) metodu, kompleks mikrobiyal populasyonun genetik çeşitliliğini doğrudan belirleyen yaklaşımlardandır. Bu metodun temeli DNA'nın denatürasyonuna yani sarmalların birbirinden ayrılması esasına dayanır. DGGE'de DNA parçaları aynı uzunluktadır fakat farklı baz çifti dizilimine göre ayrılabilirler. Farklı DNA ampikonlarının erime noktası farklı olduğundan elektroforetik olarak normal ve mutant yapılar birbirinden oluşturulan kimyasal maddelerin gradienti ile rahatlıkla ayırt edilebilmektedir. Bu metod özellikle fermentasyon süreci hakkında bilgi edinilmesi amacı ile fermente gıdalarda kullanılmaktadır (Ercolini 2004; Sofu 2009; Taşkan 2013).

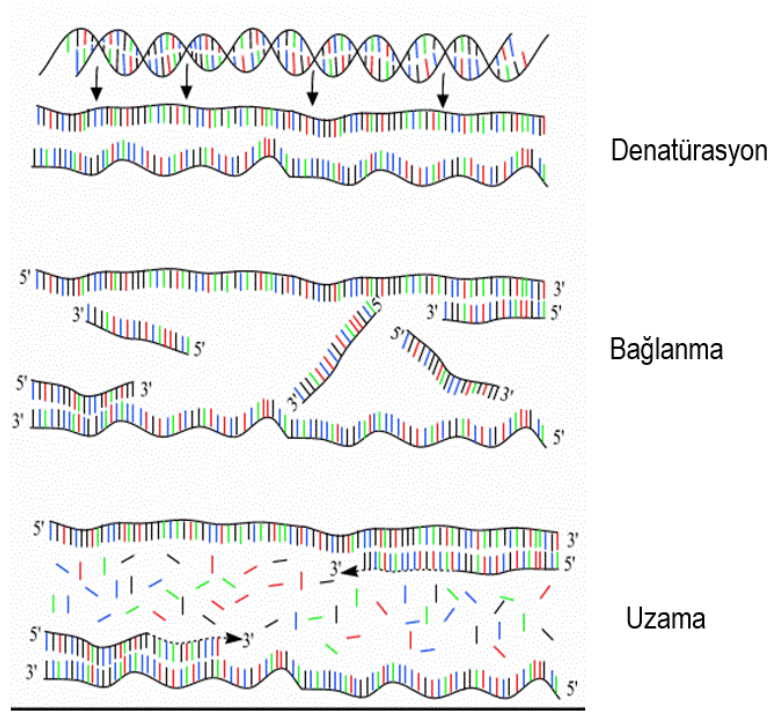
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) yüksek rezolüsyonlu, PCR temelli bir genomik fingerprinting metodudur. Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiye açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir. AFLP temelde RFLP ve RAPD-PCR tekniklerinin bir arada kullanıldığı ve identifikasyon da özellikle tür ve suş düzeyinde oldukça yüksek oranda

başarıya ulaşan popüler bir tekniktir. Ancak maliyet ve kalifiye eleman ihtiyacı, yaygın olarak kullanımını sınırlandırmaktadır (Kıran ve Ağaoğlu 2011; Lomonaco *et al.* 2011).

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) sergilemiş olduğu yüksek ayırım gücü ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliklerinden dolayı moleküler tiplendirme yöntemleri arasında “altın standart” olarak gösterilmektedir. Bu yöntem, total genomik DNA’nın kontrollü olarak restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu oluşan büyük DNA fragmentlerinin elektrikli ortamda belirli açılarla verilen elektrik akımı altında moleküler separasyonunu amaçlayan bir elektroforez yöntemidir (Erdem 2011; Lomonaco *et al.* 2011; Kıran ve Ağaoğlu 2011; Kanber 2014).

Sekans analizinde ise PCR ile elde edilen ampliconların dolayısı ile hedeflenen bölgenin nükleotid dizi analizi gerçekleştirilmektedir. Hedef bölgenin nükleotid dizilimi özel kütüphanelerle (NCBI vb) kıyaslanarak tür ve/veya suş seviyesinde tanı amacı ile kullanılabilir (Gonzalez *et al.* 2006; Gullo *et al.* 2006; Kıran ve Ağaoğlu 2011; Karacan 2013; Bilginer 2018).

Gıda kaynaklı mikroorganizmaların tespitinde kullanılan geleneksel ve PCR temelli metotlar karşılaştırıldığında, PCR temelli metotların daha hızlı, spesifik ve hassas olduğu görülmektedir (Hu *et al.* 2018). Şekil 1.1’de PCR işleminin ana basamakları görülmektedir.



Şekil 1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aşamaları (Anonymous 2007)

Real-time PCR kantitatif PCR (qPCR) olarak da bilinmekte, reaksiyon döngüsü ilerledikçe ortaya çıkan ampliconların miktarı eş zamanlı olarak belirlenebilmektedir. Klasik PCR'dan farklı olarak floresan işaretli prob veya boyaların kullanıldığı bu yöntemde, ampliconlar uzarken floresan boya DNA ile hibridize olmakta ve buna paralel olarak ışımda meydana gelen artış cihazın detektörü yardımıyla belirlenebilmektedir. Gıda bilimlerinde her geçen gün kullanımı daha da artan RT-PCR genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), gıda alerjenleri, tür tayini ve gıda kaynaklı patojenlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Günel 2007; Rodríguez-Lázaro 2013).

Klasik PCR'dan sonra yapılan işlemlerin dezavantajı genel olarak pahalı olması ve geleneksel metotlar kadar olmasa da uzun zaman almasıdır. Real-time PCR metodunda ise eş zamanlı ve daha hassas sonuç alınabilmekte, PCR sonrası rutin işlemlere gerek kalmamaktadır (Elkins *et al.* 2016; Buidamorn *et al.* 2018).

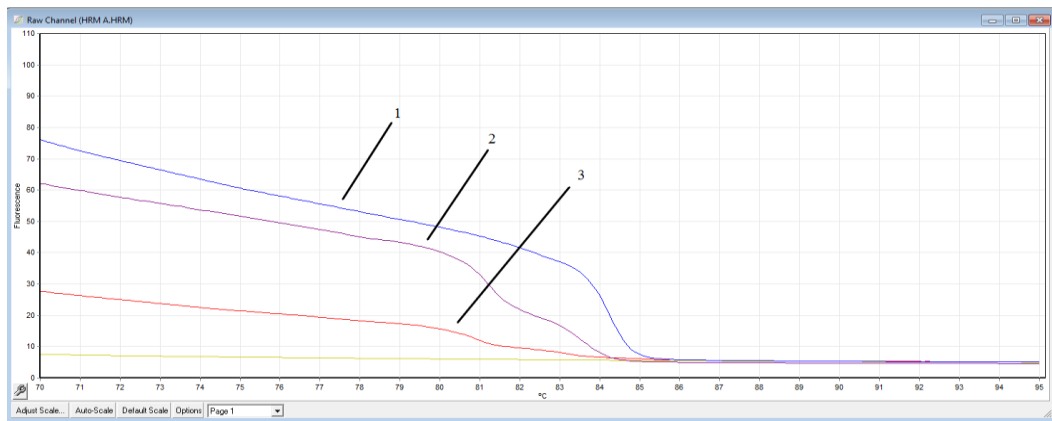
Başka bir tanılama metodu olan ve gen-çip olarak da isimlendirilen mikroarrayler ise ilk kez gen ekspresyon çalışmalarında kullanılmıştır. Bu teknoloji oligonükleotit DNA mikroarraylerin geliştirilmesiyle gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Mikroarrayler yüzlerce spesifik oligonükleotit proba kaplı cam, plastik veya silikon çiplerden oluşmaktadır. Oligonükleotit problemler 25-80 baz çifti arasında değişen kimyasal olarak sentezlenmiş kısa sekanslardır ve her bir prob bir gen dizisinin belirli bir bölümünü hedeflemektedir. Bu yöntemde kullanılacak olan nükleik asitler (DNA, mRNA veya cDNA) floresan boya ile etiketlenmekte ve daha sonra tek iplikli fragmanlar oluşturmak için denatüre edilmektedir. Bu fragmanlar daha sonra çip üzerinde bulunan ve komplementleri olan oligonükleotit problemlere hibridize olmaktadır. Hibridizasyon sonucu oluşan floresan sinyallerin yoğunluğu her bir etiketli nükleik asit fragmanının konsantrasyonu ile orantılıdır ve spesifik cihazlar ile ölçülebilmektedir. Ticari olarak temin edilebilen mikroarraylerin çoğu gen ekspresyon analizi çalışmaları için tasarlanmıştır. Gıda kaynaklı patojenlerin belirlenmesinde kullanılabilen mikroarrayler hassas ve eş zamanlı sonuç verebilmektedir. Fakat bu çipler özel üretim gerektirir ve maliyeti oldukça yüksektir (Mandal *et al.* 2011; Ekinci and Sofu 2013; Law *et al.* 2015).

Çalışmada kullanılan HRM (High Resolution Melting) analizi, tek bir nükleotid polimorfizmine (SNP) kadar dizi değişimini incelemek için kullanılabilecek hassas bir PCR sonrası işlemdir. HRM analizinde hedef diziler floresan bir interkalasyon boyası (örn; SYTO9, EvaGreen) eşliğinde Real-Time PCR cihazı kullanılarak PCR ile amplifiye edilir. Daha sonra bu PCR ampliconları, tedrici sıcaklık artışı ile eritilirken çift zincirli DNA tek zince dönüşür ve floresan ışıma keskin bir şekilde azalır. Örnekten veya saf suşlardan elde edilen DNA, erime profili ve spesifik erime sıcaklığına (T_m) göre karakterize edilebilmektedir. Spesifik erime sıcaklığı çift zincirli DNA ampliconlarının %50'sinin eridiği sıcaklık olarak tanımlanmakta ve ampliconların dizi uzunluğu, sekansı ayrıca G+C içeriğine göre değişkenlik göstermektedir. Erime analizi 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılması için daha önce de kullanılmış olmasına rağmen, gelişen teknoloji HRM'nin çözünürlük ve özgüllüğünü artırarak daha cazip hale

gelmesini sağlamıştır. HRM klasik ve moleküler metotlara göre çeşitli avantajlara sahiptir:

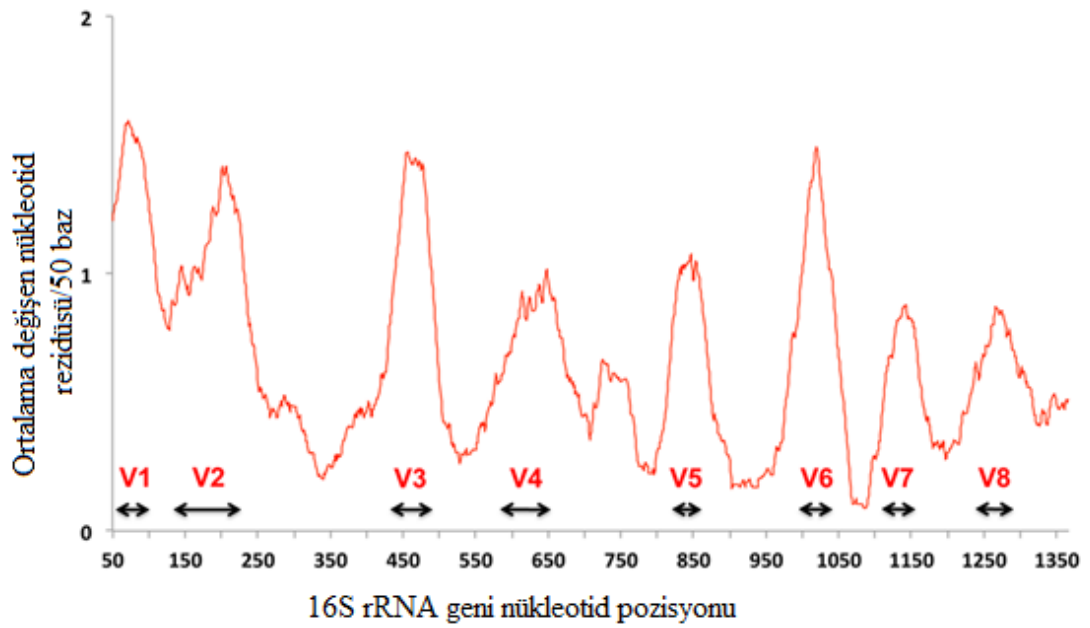
- i. PCR sonrası jel elektroforez ve sekans gerektirmemektedir,
- ii. Pahalı boya etiketli primerler veya jel reaktiflerine ihtiyaç duyulmamaktadır,
- iii. Bir veya daha fazla türün dahil olduğu multipleks bir deneyde seçilen türün DNA'sı ayırt edilebilmektedir.

Yukarıda bahsedilen özellikler HRM analizini, klasik ve diğer moleküler temelli metotlara göre daha ucuz ve kolay hale getirmektedir. HRM rutin olarak test edilen örneklerdeki (kan, tükürük, feçes, gıda) DNA'ların tanılanması veya farklılıkların belirlenmesinde kullanılabilecek düşük maliyetli bir metottur. Ayrıca, amplikon oluşturma ve görüntüleme işlemlerinin aynı tüp içerisinde art arda yapılması da kontaminasyon riskini düşürmektedir (Pestana *et al.* 2010; Druml and Cichna-Markl 2014). Bu üstün özelliklere rağmen Real-Time PCR HRM analizi, canlı ve ölü hücreleri birbirlerinden ayıramamaktadır (Rudi *et al.* 2007; Porcellato *et al.* 2012; Dhakal *et al.* 2013; Elkins *et al.* 2016; Bundidamorn *et al.* 2018). Şekil 1.2'de aynı karışımdaki mikroorganizmaların HRM analizi ile ayrımı görülmektedir.



Şekil 1.2. Örnek bir HRM kütres; *L. casei* (1), *L. casei*-*E. coli* (2) karışımı ve *E. coli* (3) (Çetin and Aktaş 2018).

16S rRNA geninin tüm bakterilerde bulunması, evrimsel süreç boyunca oldukça iyi korunması ve yeterince uzun (1500 bç) olmasından dolayı bakterilerde filogeni ve taksonomi çalışmalarında kullanılmaktadır (Janda and Abbott, 2007). Bu gen dokuz farklı yüksek değişkenlik gösteren bölge (V1-V9) içermekte ve moleküler çalışmalarda bu bölgelerden yararlanılmaktadır. Çalışmada 16S rRNA geninin yüksek değişkenlik gösteren bölgelerinden V3 kullanılmıştır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. 16S rRNA geninin *E. coli* için yüksek değişkenlik gösteren bölgeleri (Vasileiadis *et al.* 2012).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Konu ile ilgili kaynaklar çalışmamızın ana başlıkları itibari ile incelendiğinde üç ana grup şeklinde verilmesinin uygun olduğu görülmektedir. Bunlar; koliform grubu bakteriler, morfolojik ve biyokimyasal testler ile HRM analizidir. Çalışmamızla ilgili literatür belirtilen başlıklar çerçevesinde aşağıda sunulmaya çalışılmıştır.

Keskin vd (1993), tarafından gerçekleştirilen çalışmada İstanbul Üsküdar Belediyesine bağlı 20 semt pazarındaki 50 Beyaz peynir satıcısından temin edilen numuneler mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir. TAMB ile maya-küf sayımı yapılmış ve peynir örneklerinde koagülaz (+) stafilokok, total koliform, *E. coli*, *Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens* varlığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda numunelerin %96'sında koliform bakteri, %86'sında *E.coli*, %66'sında *S. aureus*, %52'sinde *C. perfringens* ve tamamında küf ve maya geliştiği ancak *Salmonella* spp. ile *L. monocytogenes*'e rastlanmadığı bildirilmiştir. Elde edilen mikrobiyolojik bulgular ışığında tüketime sunulan peynir örneklerinin ilgili yönetmeliklere uygun olmadığı ortaya konulmuştur.

Tekinşen vd (1993), Elazığ piyasasında satışa sunulan Şavak peynirlerinde koliform grubu bakteriler üzerine çalışmışlardır. Analize tabi tutulan peynir örneklerinin hepsinde koliform türleri tespit edilmiş ve ürünlerde görülme sıklığı sırası ile %75,6 *Aerobacter aerogenes* I, %70,1 *Escherichia coli* I, %48,9 *Escherichia freundii* I, %22,2 *Escherichia coli* II, %13,3 *Aerobacter aerogenes* II ve %6,7 *Escherichia freundii* II şeklinde bildirilmiştir.

Dığrak ve Özçelik (1996), Elazığ kapalı çarşısında tüketiciye sunulan Beyaz peynir ve Şavak (Erzincan tulum) peynirlerinden koliform grubu bakteriler izole edip, IMViC ve bazı biyokimyasal testlerle doğrulamışlardır. Çalışmaya ait verilerin incelenmesi sonucu Şavak peynirlerinden izole edilen 316 adet koliform bakteriden, 72'si *E. coli* tip I, 32'si ise *E. coli* tip II olarak tespit edilmiştir. Taze peynirlerden izole edilen 302

adet koliform bakteriden ise 86'sı *E. coli* tip I, 42'si *E. coli* tip II olarak tanımlanmıştır. Araştırmada gerçekleştirilen testler sonucu tanımlanamayan 19 suşun olduğunu da bildirmişlerdir.

Kasımoğlu (1998), modern bir süt işletmesinde üretilen Beyaz peynirlerde gerçekleşen kontaminasyon kaynaklarının belirlenerek, alınabilecek önlemlere yön vermesi açısından elde edilen bulguları değerlendirmiştir. Çalışmada üretim basamaklarının farklı noktalarından alınan numuneler için çeşitli mikroorganizma gruplarında tespit edilen değerler kaydedilmiştir. Bu veriler sonucunda üretim açısından olumsuz koşullara sahip olduğu görülen süt işletmesinin, belirlenen kritik noktalarına ilişkin alınabilecek önlemler detaylı olarak açıklanmıştır. Tedbirlerin uygulanması sonucu peynir kalitesine yansıyan olumsuz etkenlerin ortadan kaldırılabileceği elde edilen verilerle savunulmuştur. Araştırma başlamadan önce ve çalışmanın ilk 6 haftasında üretilmiş olan peynirlerin teneke ambalajlarında şişme gözlenmiştir. Bu peynirlerde yapılan analizler sonucu 5-6 log kob/g gibi yüksek oranda koliform değerleri saptanmış ve 16 ton peynir imha edilmek üzere toplanmıştır.

Saltan Evrensel vd (2003), mandıra düzeyindeki işletmelerde Beyaz peynir üretiminde kritik kontrol noktalarını belirlemeye çalışmışlardır. Bu amaçla üretim hattı boyunca 23 farklı noktadan numune alınarak TAMB, stafilokok-mikrokok, koagülaz pozitif stafilokok, enterobakteriler, koliform bakteri, *E. coli*, enterokok, maya ve küf sayıları yönünden incelenmiştir. Koliform sayısı sadece bir örnekte tespit edilemezken en yüksek değer 7,32 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Çalışmada çiğ sütteki kalite düşüklüğünün, pastörize süt ve ürünlerin kalitesine de olumsuz etkide bulunduğu kanaatine varılmıştır.

Baz vd (2003) Kars ilinde satışa sunulan çiğ süt ve taze Beyaz peynirlerde koliform grubu bakteriler ve *E. coli* üzerine inceleme yaptıkları çalışmada, çiğ süt ve peynir örneklerinin tamamında koliform geliştiği saptanmıştır. Piyasadan temin edilen 100 Beyaz peynir örneğinin koliform sonuçlarında >6 log kob /g olduğu 19 örnek ve *E. coli* için >6 log kob /g olduğu 13 örnek tespit edilmiştir. Çalışma sonucu örneklerde

gözlenen yüksek koliform ve *E. coli* değerleri göz önünde bulundurularak ürünlerin halk sağlığına uygun olmadığı ifade edilmiştir.

Ulusoy (2004) çalışmasında, Ankara'daki çeşitli semt ve marketlerden temin edilen çiğ süt ve peynir örneklerinde koliform grubu mikroorganizma ve *E. coli* izolasyonu gerçekleştirmiştir. Çiğ süt örneklerinde 3,84-4,48 log kob/mL arasında koliform ve 3,70-4,48 log kob/mL aralığında *E. coli* sayısı değişimi rapor edilmiştir. Peynir örneklerinde ise bu değerlerin koliform için 3,87-5,04 log kob/g, *E. coli* için ise 2,55-5,04 log kob/g aralığında değiştiği bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre en az bir örneğin içerdiği koliform grubu izolatların tümünün *E. coli* olduğu anlaşılmaktadır.

Alas (2004), Ankara piyasasında tüketime sunulan Beyaz peynir ve sade dondurmada yaptığı çalışmasında *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, koliform, fekal koliform ve *E. coli* varlığını tespit etmeye çalışmıştır. Çalışmada toplam peynir örneklerinin %26'sında koliform grubu mikroorganizma tespit edilirken en yüksek değer 3,04 log kob/g olarak bildirilmiştir.

Çetinkaya and Soyutemiz (2006) tarafından yapılan çalışmada 12 adet kaşar peynir prosedürü, üretim ve olgunlaştırma periyodu boyunca laktik asit bakterileri, total aerobik mezofilik bakteri, psikrofil mikroorganizmalar, maya, küf ve koliform sayılarında meydana gelen değişimler ile *E. coli* varlığı açısından incelenmiştir. Koliform bakterilerin sayımı Violet Red Bile (VRB) besiyeri kullanılarak yapılmıştır. VRB'de elde edilen tipik koloniler durham tüpü içeren Lactose Broth'ta inkübe edilmiş ve gaz oluşumu gözlemlenen suşlara indol, metil, voges-proskauer ve sitrat (IMViC) testleri yapılmıştır. IMViC testlerinde sırasıyla (+,+,+,-) sonuç alınan örnekler *E. coli* pozitif olarak değerlendirilmiştir. 12 farklı çiğ sütün 2 tanesinde *E. coli* tespit edilmiş fakat peynir üretiminde uygulanan haşlama (75°C'de 5 dak.) işleminden sonraki üretim ve olgunlaştırma aşamalarında koliform veya *E. coli* tespit edilememiştir. Çalışma sonuçları kaşar peynir üretiminde uygulanan haşlama işleminin koliform grubu bakteriler ve özellikle *E. coli*'nin inhibisyonunda etkili olduğunu göstermektedir.

Nespolo and Brandelli (2012), Brezilya’da koyun ve keçi sütlerinden üretilen Feta peynirlerinin karakterizasyonu ve bir süt fabrikasında işleme alanlarının mikrobiyolojik değerlendirmesi üzerine  alı mı lardır. Koliform değerlerin koyun ve keçi sütünden üretilen Feta peynirlerinde sırası ile 1,63 log kob/g ve 1,50 log EMS/g olduğu tespit edilmiştir. Peynirlerden elde ettikleri mikrobiyolojik değerlerin mevzuatlarına uygun oldukları bildirilmiştir.

Ajitkumar *et al.* (2012), 16S rRNA genindeki V5 ve V6 bölgelerinin HRM analizi ile sığır larda mastitise neden olan *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium bovis* ve *Streptococcus dysgalactiae* patojenlerini belirlemişlerdir. *S. uberis*’e ait PCR amplikonlarında oluşan heterojenlikten dolayı streptokokların tespitinde zorluk yaşanmasına rağmen, patojenler bu metot kullanılarak %95 doğrulukla tespit edilmiştir. Yapılan  alı ma HRM’nin sığır larda mastitise sebep olan patojenlerin belirlenmesinde kullanılabilecek hızlı ve düşük maliyetli bir metot olduğunu göstermektedir.

Akel (2013), Van piyasasında tüketime sunulan Feta peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesini belirlemek amacıyla 50 örnek kullanmıştır. Çalışmada çeşitli mikroorganizmalara yer verilmiş olup i lerinde koliform grubu bakterilerin sayısı 0,78 log kob/g, *E. coli* sayısı ise 0,10 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Elde ettiği kimyasal ve mikrobiyolojik veriler sonucunda Feta peynirlerinin kalitesinin yetersiz olduğu ve tüketicisi sağlığı açısından risk oluşturabileceği sonucuna varmıştır.

Arslan ve  zdemir (2013) yaptıkları çalışmada, Türkiye’de üretilen 245 adet ev yapımı Beyaz peynir örneğini *E. coli* O157 içerip i emediği açısından değerlendirmişlerdir. MacConkey agar kullanılarak elde edilen izolatlara biyokimyasal testler yapıldıktan sonra 223 izolatın *E. coli* olduğu belirlenmiştir. Daha sonra bu izolatlar sefiksim-tell rite içeren sorbitol MacConkey besiyerinde sorbitol  fermente etme açısından değerlendirilmiş ve sorbitol  fermente edemeyen 21 su un *E. coli* O157 olma ihtimalinden   phelenilmi tir. Uygulanan lateks aglütinasyon testi

sonuçlarına göre bu izolatların *E. coli* O157 olmadığı anlaşılmamasına rağmen Beyaz peynirlerde diğer *E. coli* suşlarının bulunması tüketiciler için potansiyel bir sağlık riski olarak değerlendirilmiştir. Bahsedilen çalışmada uygulanan kültürel ve biyokimyasal metotların yaklaşık olarak 48 saat gerektirmesi dikkat çekmektedir.

İki farklı STEC suşu olan *E. coli* O26: H11 ve *E. coli* O157: H7'nin çiğ süttten üretilen peynirler ve simüle insan sindirim sisteminde hayatta kalma oranı Miszczycha *et al.* (2014) tarafından araştırılmıştır. Çiğ sütler ayrı ayrı her bir suştan 500 kob/mL içerecek şekilde kontamine edilmiş ve peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretimin ilk 24 saatinde peynirdeki her iki STEC suşunun sayısı 2 log kob/mL'den, 4 log kob/mL'ye çıkmış ve 20 günlük olgunlaştırma süresince yaklaşık 4 log kob/mL'de sabit kalmıştır. Marker olarak kullanılan mavi dekstranla karşılaştırıldığında, *E. coli* O157:H7 suşlarının %0,2'sinin *E. coli* O26: H11 suşlarının ise %1,8'inin yapay mide ve bağırsak ortamında hayatta kalabildiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, STEC suşları arasında simüle insan sindirim sisteminde hayatta kalma oranları açısından farklılık bulunduğunu ve *E. coli* O26:H11'in *E. coli* O157: H7'den daha fazla dayanabildiğini ortaya koymuşlardır.

Çelik (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, yoğurt yapımı ve muhafazası esnasında Shiga toksin üreten *E. coli* O157:H7, O26, O111, O103 ve O145 (STEC) serogruplarının üründe dayanımı araştırılmıştır. Sütün pastörizasyonunu takiben starter kültür ile birlikte her bir patojenden ayrı ayrı yaklaşık 10^7 kob/g olacak şekilde inoküle edilmiştir. İnkübasyon (44°C) işleminin ardından yoğurtlar 4°C'de 20 gün depolanmış ve patojenler depolamanın 0, 5, 10, 15 ve 20. günlerinde Sorbitol MacConkey agar kullanılarak sayılmıştır. Sütün inkübasyonu sonucu oluşan yoğurtlardaki *E. coli* O157, O26, O111, O103, O145 sayısı sırasıyla 4,11; 4,05; 4,03; 4,16 ve 4,06 log kob/g olarak bulunmuştur. Depolamanın 20. gününde yapılan sayımda ise *E. coli* O157:H7, O103 ve O145 tespit edilemeyecek seviyenin altına düşmüş, O26 ve O111 sayıları ise sırasıyla 1,51 ve 1,18 log kob/g olarak tespit edilmiştir. STEC serotiplerinin yoğurdun üretim ve depolanması esnasında canlı kalabilmesi, kontamine olan yoğurtların tüketiminin önemli sağlık sorunlarına sebep olabileceğini göstermektedir.

Guzman-Hernandez *et al.* (2016) tarafından yapılan bir diğer araştırmada, Meksika’da çiğ süttten üretilen taze peynirlerin sırasıyla %67 ve %63 oranlarında fekal koliform ve *E. coli* içerdiği belirlenmiştir. *E. coli*’ye ait 26 virölans genin bakıldığı çalışmada, 53 numunenin 9’unda diyarejenik *E. coli*, 8’inde O157 olmayan Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC), 1 numunede hem STEC hem de diffuz-adhering *E. coli* (DAEC), 15 numunede ise potansiyel üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşlarını tespit etmişlerdir. *Salmonella* analizi de yapılan çalışmada 2 peynir numunesinin bu patojenle kontamine olduğu anlaşılmıştır. Sonuçlar, Meksika’da pastörize edilmemiş süttten üretilen peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin düşük olduğunu ve sıklıkla gıda kaynaklı patojenleri barındırabildiğini göstermektedir.

Diyarel (ishal) ve emetik (kusma) sendrom olmak üzere iki farklı gıda zehirlenmesine sebep olan *Bacillus cereus*’un hızlı tespiti için Real-Time PCR HRM metodunun kullanıldığı çalışmada, 4 majör enterotoksin geni (*cytK*, *entFM*, *hblD*, *nheA*) ve emetik toksin geni (*ces*) hedef alınmıştır. Analizler 17 emetik *B. cereus*, 9 enterotoksik *B. cereus*, 4 *B. cereus* grup üyesi, 23 yabancı *B. cereus* ve 18 *B. cereus* olmayan suş kullanılarak doğrulanmış ve yapay olarak kontamine edilen gıdalarda da test edilmiştir. İlgili patojenlerde bahsedilen genler için ortalama erime sıcaklıkları 72,20°C (*ces*), 74,23°C (*cytK*), 76,55°C (*nheA*), 78,42°C (*entFM*) ve 81,90°C (*hblD*) olarak bulunmuştur. Yöntemin gıda numunelerindeki tespit limiti zenginleştirme olmadan 10³ kob/g, 7 saat zenginleştirme yapıldığında ise 10¹ kob/g olarak belirlenmiştir. Kültür temelli metotlar ile 3 gün içerisinde tespit edilebilen *B. cereus*, Real-Time PCR HRM kullanılarak 12 saatten daha az bir sürede belirlenebilmiş ve tespit edilen suşların toksijenik profilleri hakkında ek bilgi sağlanmıştır (Forghani *et al.* 2016).

Punoo *et al.* (2018), Keşmir bölgesine özgü Kradi peynirinin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmada yağ, protein, nem, kül, laktoz muhtevası ve asitlik gibi özelliklerinin yanında TAMB, koliform ve maya-küf analizinin de gerçekleştirildiği görülmekte olup, koliform sayısının 3,92-4,38 log

kob/g, TAMB sayısının 4,96-5,25 log kob/g, maya-küf sayısının ise 3,84-4,22log kob/g aralığında değiştiğini bildirmişlerdir.

Ioanna *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada, Cacioricotta keçi peynirinin üretimi ve olgunlaştırılması sırasında *Escherichia coli* O157:H7'nin gelişme ve hayatta kalma durumunu değerlendirmişlerdir. Keçi sütleri 10^2 kob/mL *E. coli* O157:H7 ile kontamine edilmiş ve peynir üretildikten sonra olgunlaşmanın 90. gününe kadar izlenmiştir. Olgunlaşmanın ilk haftası boyunca 6,20 log kob/g'a çıkan *E. coli* O157:H7 sayısı, 28. güne kadar sabit kalmış ve olgunlaşma sonunda 4,30 log kob/g'a kadar düşmüştür. Sonuçlar üretim ve olgunlaştırma işlemlerinin *E. coli* O157:H7'yi inhibe etmek için yeterli olmadığını ve düşük miktarda da olsa bu patojenle kontaminasyonun salgınlara yol açabileceğini göstermektedir.

Liu *et al.* (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, gıda örneklerinde bulunan *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi için HRM kullanılmıştır. PCR işleminde patojeniteden sorumlu olan *invA*, *stn* ve *fimA* genlerine spesifik primerler tasarlanmıştır. Metot, 81 *Salmonella* suşu ile doğrulanmış ve uygulanabilirliği çok çeşitli gıda numunelerinde (biftek, yağsız süt, badem, ıspanak vb.) test edilmiştir. Çalışma sonuçları 10^3 kob/g *Salmonella* ile kontamine edilen 24 farklı gıda örneğinin 25 gramında, 6 saatlik bir zenginleştirme işleminden sonra, hedef genlerin tespit edilebildiğini göstermektedir. *Salmonella* tespiti kültür temelli metotlarla 48-72 saat arasında gerçekleştirilebilirken, HRM ile zenginleştirme aşaması dahil toplam 10 saat sürmüş ve yoğun iş yükü oldukça azaltılmıştır.

Bundidamorn *et al.* (2018), gıdalarda bulunan Shiga toksin üreten *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes*'in eş zamanlı olarak aynı tüpte belirlenmesi için Real-Time PCR HRM metodunu kullanmışlardır. 18 saat zenginleştirme işlemini takiben DNA ekstraksiyonu yapılmış ve her bir patojenin DNA'sı aynı tüpe alındıktan sonra EvaGreen boyası eşliğinde Real-Time PCR HRM uygulanmıştır. Erime sıcaklıkları STEC, *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* için sırasıyla ortalama $84.52 \pm 0.90^\circ\text{C}$, $87.51 \pm 0.54^\circ\text{C}$ ve $79.32^\circ\text{C} \pm 0.48^\circ\text{C}$ olarak

bulunmuş ve 3 ayrı spesifik tepe noktası belirlenmiştir. Yöntemin uygulanabilirliği bu patojenlerle kontamine edilen gıdalarda da doğrulanmış ve tespit limiti 1 kob/25 g olarak bulunmuştur. Bu üç patojenin tespiti standart metotlarla en az 4 gün sürerken Real-Time PCR HRM kullanılarak zenginleştirme aşaması dahil toplam analiz süresi 20 saate kadar düşürülmüştür.

Cisse *et al.* (2019), Burkina Faso'da farklı hayvan sütlerinden üretilen fermente ürünlerin mikrobiyolojik ve bazı kimyasal karakteristiklerini belirlemeye çalıştıkları araştırmalarında mikrobiyolojik olarak TAMB, LAB (laktik asit bakterileri), maya-küf, *S. aureus*, toplam koliform ve termotolerant koliform parametrelerini incelemişlerdir. Sayım işlemleri sonucunda log kob/ml cinsinden 9,88 TAMB, 7,76 LAB, 5,70 maya-küf, 3,29 *S. aureus*, 3,30 toplam koliform ve 2 termotolerant koliform değerlerini bulmuşlardır.

Merchan *et al.* (2019) yaptıkları çalışmalarında, Kolombiya'da geleneksel yöntemlerle üretilmiş 31 peynir örneğini ulusal standartlarına göre değerlendirmişlerdir. Örneklerin TAMB, toplam koliform, fekal koliform, *S. aureus* ve maya-küf sayılarını sırası ile 6,78; 5,80; 5,60; 5,20 ve 5,61 log kob/g olarak bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar peynir numunelerinin mikrobiyal yükünün oldukça yüksek olduğu ve peynir üretiminde hijyen kurallarına uyulmasının gerekliliğini vurgulamışlardır.

Ekici *et al.* (2019), Van otlu peynirinde biyojenamin, bazı mikrobiyolojik ve fizikokimyasal parametrelerin incelemesini gerçekleştirmişlerdir. 100 peynir örneğinin analizlerinin gerçekleştirildiği çalışmada 4,0-8,90 log kob/g TAMB, <1-6,08 log kob/g koliform, 3,70-8,05 log kob/g maya-küf ve <1-2,60 log kob/g aralığında *S. aureus* varlığı tespit edilmiştir.

Bozatlı (2019) sosislerde Shiga toksin üreten *E. coli* O157:H7, O103, O26 ve O145 serotiplerinin canlı kalma süreleri ve asit dayanımlarını belirlemiştir. Her bir serotipten piyasadan toplanan (üretimden sonra) ve laboratuvar koşullarında üretilen sosislere (üretim esnasında) 10^5 - 10^6 kob/g olacak şekilde kontamine edilerek vakum ambalaj

içerisinde 75 gün depolanmış ve depolamanın 0, 15, 30, 45 ve 75. günlerinde Sorbitol MacConkey agar kullanılarak sayım yapılmıştır. Aynı zamanda bu serotiplerin simüle mide sıvısında dayanımlarını incelemek amacıyla kontamine edilen sosisler depolamanın 0, 15, 30, 45 ve 75. günlerinde mide sıvısı ile homojenize edildikten sonra 37°C'de inkübe edilmiş ve 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda sayım yapılmıştır. Çalışma sonucunda rekabetçi mikrofloranın (özellikle laktik asit bakterileri) olduğu piyasa örneklerinde STEC serotiplerinin gelişiminin olumsuz etkilendiği bulunmuştur. Üretim esnasında kontamine olan sosislerde ise rekabetçi mikrofloranın patojen gelişimine herhangi bir olumsuz etki göstermediği belirlenmiştir. Piyasa örneklerinde bulunan STEC serotiplerinde azalma belirlenmesine rağmen, enfektif dozun düşük olduğu göz önüne alındığında, bu patojenlerle kontamine olan sosislerin risk teşkil ettiği ifade edilmektedir. Simüle mide sıvısı denemelerinde ise STEC O157:H7 serotipinin dayanımı depolamanın 45. gününden itibaren azalmış ve 75. günde tespit edilememiştir. Bunun aksine STEC O103, O26 ve O145 serotipleri 75. güne kadar mide simülasyon çözeltisinde 90 dakika boyunca dayanıklılık göstermiştir.

Bu çalışmada temel olarak, kontaminasyon kaynağının belirlenmesinde *E. coli* suşlarının tiplendirilebilirliği araştırılmıştır. Böylece son üründe gözlenen *E. coli*, üretimin farklı aşamalarında izole edilen diğer *E. coli* suşlarıyla kıyaslanarak kontaminasyon kaynağı belirlenebilecektir. Bu kapsamda yerel ve ulusal firmalardan 22 adet Beyaz peynir örneğinin mikrobiyolojik kalitesi (toplam aerobik mezofilik bakteri, maya-küf, koliform grubu bakteriler ve *S. aureus* sayımları) belirlenmiştir. Ayrıca örneklerden *E. coli* izolasyonu gerçekleştirilmiş olup suşlar arasında ki muhtemel farklılıklar ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Böylece farklı *E. coli* suşlarının bulunabileceği bir kültür koleksiyonu oluşturulmuştur. Koleksiyondaki suşların farklılıkları biyokimyasal (IMViC) ve moleküler (HRM) yöntemlerle belirlenmiştir. Ardından aynı işletmenin farklı üretim aşamaları ve ürünlerinden izole edilen *E. coli* suşları, kontaminasyon kaynağının belirlenmesi amacıyla moleküler ve biyokimyasal yöntemlere tabi tutulmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Denemede kullanılan metotların *E. coli* suşları arasındaki farklılığı belirleyebilme kabiliyetini tespit etmek için *E. coli* izolatlarından bir kültür koleksiyonu oluşturulmuştur. Bu amaçla aynı gıda çeşidinde bulunabilecek farklı *E. coli* suşlarının izolasyonu için 22 farklı yerel ve ulusal Beyaz peynir örneği kullanılmıştır. Kontaminasyon takibinin gerçekleştirilebilirliğinin gözlenebilmesi için de aynı işletmenin farklı ürün, yardımcı ekipman, hammadde ve üretim aşamalarından oluşan toplamda 25 adet örnek alınmıştır. Tüm çalışma boyunca *E. coli* ATCC 11775 suşu referans olarak kullanılmıştır. İlgili örneklere ait bilgiler Çizelge 3.1’de sunulmuştur. Elde edilen tüm örnekler +4°C’de muhafaza edilerek analizleri yapılmak üzere derhal laboratuvara getirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan işletme numuneleri ve kaynakları

Ham madde ve Ara Ürünler	Ürünler
Çiğ süt 1	Ambalajlı yağlı Civil peynir
Çiğ süt 2	Yağsız Civil peynir
Cendere bezi sıkma suyu	Kaşar peynir
Teleme suyu (ilk mayalanma)	Didilmiş (tel haline getirilmiş) yağlı
Salamura suyu	Civil peynir
Teleme suyu (baskı aşaması)	Didilmemiş yağlı Civil peynir
Kuyu suyu (sistem başı)	
Kuyu suyu (sistem sonu)	
Şebeke suyu (sistem başı)	
Şebeke suyu (sistem sonu)	
Kaşar telemesi	

Çizelge 3.1. (devam)

Personel Svapları ve Yardımcı Ekipman Yüzeyi
Cendere bezi
Çiğ süt tankı
Personel 1 eldiven swap
Personel 2 eldiven swap
Ambalaj cihazı (üst mekanizma)
Ambalaj cihazı (ambalaj materyali)
Ambalaj cihazı (alt mekanizma)
Kaşar kalıbı 1
Kaşar kalıbı 2

3.2. Yöntem

Denemede kullanılan piyasa peynirleri ve fabrika numunelerinde öncelikle temel mikrobiyolojik parametrelerden TAMB, maya-küf, *S.aureus* ve koliform grubu bakterilerin sayımları gerçekleştirilmiştir. *E. coli* izolasyonu amacıyla VRB agarda gözlenen tipik koloniler EMB besiyerine çizilerek, ön değerlendirmeden geçirilmiş ve biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Bu amaçla gerçekleştirilen işlem basamaklarına aşağıda yer verilmiştir.

3.2.1. Dilüsyonların hazırlanması

Örneklerdeki hedef mikroorganizmaların sayımı ve izolasyon işlemlerinin gerçekleştirilebilmesi adına seyreltme işlemi için %0,85 NaCl ve %0,1 pepton içeren steril fizyolojik çözelti kullanılmıştır. Katı numunelerin hazırlanmasında 10 g örnek tartılıp, 90 ml steril fizyolojik çözelti içerisinde stomacher (MAYO HG400) yardımıyla homojenize edilerek ilk dilüsyon elde edilirken, sıvı numunelerde 1 mL örnek, 9 mL steril fizyolojik çözelti içerisinde vorteks yardımıyla karıştırılarak homojenize edilmiştir. Hazırlanan desimal dilüsyon serilerinin ardından ilgili petrilere

2 paralel çalışma olacak şekilde mikrobiyolojik ekimler gerçekleştirilmiştir (Harrigan 1998).

3.2.2. Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı

Çalışma örneklerindeki TAMB sayılarının belirlenmesi için yayma kültürel sayım yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla ilgili dilüsyonlardan, steril Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyeri bulunan petri plaklarına 0,1'er mL aktarılarak ekim işlemleri gerçekleştirilen mikroorganizmalar, 30-32°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu petrilere tespit edilen sayılar, dilüsyon faktörü ile çarpılarak örneklerin 1 mL'sinde bulunan TAMB yükü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar sıvı örnekler için log kob (koloni oluşturan birim)/mL, katı örnekler için ise log kob/g olarak ifade edilmiştir (Maturin and Peeler 1998).

3.2.3. Maya-küf sayımı

Otoklavda steril edilen Potato Dekstrose Agar (PDA, Merck) besiyeri, %10'luk steril laktik asit çözeltisi ile asitlendirilerek (pH 3,5) katılaşması için petrilere dökülmüştür. Ekim işlemi için hazır hale gelen petrilere ilgili dilüsyonlardan gerekli aktarımlar yapılarak oda sıcaklığında 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerin mikroskopik ve makroskopik incelemeleri yapıp, sayım sonuçları kaydedilmiştir (Speck 1984).

3.2.4. *S. aureus* sayımı

S. aureus sayımı için hazırlanan Baird Parker Agar (BPA, Oxoid) besiyeri steril edildikten sonra 45°C'ye soğutulurken, üzerine oda sıcaklığına getirilmiş yumurta sarısı-tellurit (Egg-yolk tellurit, Oxoid) emülsiyonu ilave edilip (50 mL/L) karıştırıldıktan sonra petrilere aktarımı gerçekleştirilmiştir. Katılaşan besiyerine uygun dilüsyonlardan ekim yapılarak petrilere 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda numunelerde tipik koloni gelişimi gözlenmemiştir (Pichhardt 2004).

3.2.5. Koliform grubu bakterilerin sayımı ve muhtemel *E. coli* suşlarının izolasyonu

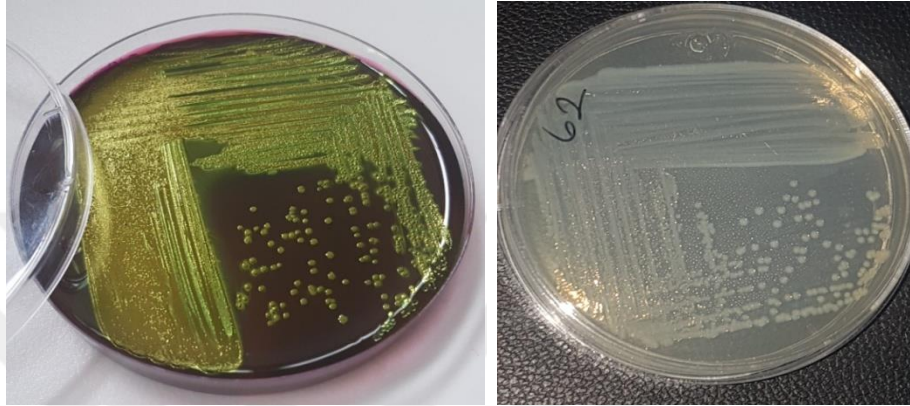
Örneklerde bulunan koliform mikroorganizmaların sayımı ve *E. coli* suşlarının izolasyonu amacıyla VRB agar (Merck) kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan ekimi gerçekleştirilen petriler, 35–37°C’de 1-2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen 1-2 mm çapında, haleli, kırmızı koloniler tipik koliform bakteri olarak değerlendirilmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 2002). Şekil 3.1’de VRB agarda gelişen koliform grubu bakterilerin görünümü verilmiştir.



Şekil 3.1.VRB agarda gelişen koliform grubu bakterilerin görünümü

VRB agardan makroskobik ve mikroskobik incelemelerle desteklenen tipik kolonilerin ön *E. coli* değerlendirmesi amacıyla EMB agara (Merck) üçlü çizimleri gerçekleştirilerek, petriler 35-37°C’de 1 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu gözlenen metalik parlak yeşil koloniler muhtemel *E. coli* olarak değerlendirilip, Nutrient agara (Merck) çizilmiştir. Çizimi gerçekleştirilen petriler 35-37°C’de 1 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerden diğer testlerde kullanılmak üzere 3 öze dolusu toplanarak, %20 gliserol eşliğinde LB Broth (Luria

Bertani, Merck) besiyeri içerisine alınıp -80°C’de muhafaza edilmiştir (şekerci 2012). şekil 3.2’de VRB’den alınarak EMB besiyerine çizimi gerçekleştirilen muhtemel *E. coli* bakterileri (sol) ve -80°C’den Nutrient agarda canlandırılan saf kültür izolatı (sağ) verilmiştir.



şekil 3.2. EMB agara çizimi gerçekleştirilen *E. coli* bakterileri (sol) ve -80°C’den Nutrient agarda geliştirilen saf kültür izolatı (sağ)

İzolatların tümü -80°C’den Nutrient agarda canlandırılarak taze kültürleri elde edildikten sonra morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi ve IMViC testlerine tabi tutulmuştur.

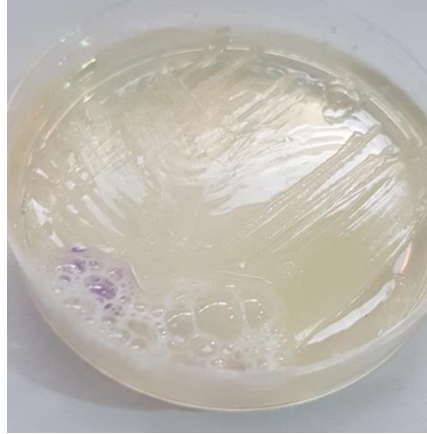
3.2.5.a. Gram boyama

Gram boyama testi ile hücrelerin morfolojik özellikleri hakkında bilgi edinilerek gram pozitif ve gram negatif türler ayırt edilebilmektedir. Doğru sonuçların alınabilmesi için gram boyamada genç kültür (16-24 saat) kullanılmalıdır. Bu metot için lam üzerine bir damla distile su damlatılıp, genç kültürden ze yardımıyla alınarak lam yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Hazırlanan preparat alevden geçirilerek fıkse edildikten sonra kristal viyole ile boyanıp, 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra lam yüzeyi su ile yıkanarak üzeri lugol eltisi ile kaplanmıştır. Ardından lugol eltisi lam üzerinden akıtılarak, etil alkol ve su ile yıkanmıştır. Son olarak sulu karbolfksin ile boyanarak 30 saniye bekletilen preparat, tekrar su ile yıkaması gerçekleştirildikten sonra

kurumaya bırakılmıştır. Sonuçlar normal ışık mikroskopunda (Olympus BX51T Scientific) incelenerek gözlenen renge göre değerlendirme yapılmış olup, mor renkli bakteriler gram pozitif, pembe renkli bakteriler ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Karahan vd 2002).

3.2.5.b. Katalaz testi

Katalaz bir enzim olup, ortamdaki hidrojen peroksiti (H_2O_2), su ve oksijene parçalayarak varlığını göstermektedir. Muayane edilecek saf kültürler taze olmalıdır, aksi takdirde eski kültürler yalancı negatif sonuçlar verebilir. Taze kültürlerin üzerine %3'lük H_2O_2 'den (Merck) damlatıldıktan sonra serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenmesi katalaz varlığına işaretler. H_2O_2 çözeltisi etkinliğini koruması için buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmelidir. Sonuç olarak gaz oluşumu gözlenen koloniler katalaz (+), gaz oluşturmeyenleri ise katalaz (-) olarak kaydedilmiştir (Cisem 2003). Şekil 3.3'de katalaz (+) reaksiyon sonucu verilmiştir.



Şekil 3.3. Katalaz pozitif reaksiyon sonucu

3.2.5.c. Oksidaz testi

Bakterilerdeki sitokromoksidaz enziminin varlığını ortaya koymak amacıyla kullanılmaktadır. Oksidaz testi için taze kültürden steril öze yardımı ile bir miktar

alınarak strip (Merck) üzerine sürülmüştür. 10 saniye bekledikten sonra mavi-mor renk oluşumu gözlenenler oksidaz (+), renk değişimi gözlenmeyen koloniler ise oksidaz (-) olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.4’de 5 nolu izolata ait oksidaz pozitif test sonucu verilmiştir (Pichhardt 2004).



Şekil 3.4. 5 nolu izolata ait oksidaz pozitif reaksiyon sonucu

3.2.5.d. IMViC testi

EMB besiyerinde metalik parlak yeşil renk oluşturan kültürlerin *E. coli* doğrulamasını yapmak üzere bu testlerden yararlanılmıştır. IMViC; indol, metil kırmızısı, Voges Proskauer ve sitrat testlerinin baş harfleri kullanılarak oluşturulmuş kısaltmasıdır. Test sonuçlarına göre bir sonraki adım olan moleküler metotlarda kullanılmak üzere *E. coli* suşları belirlenmiştir (Holt *et al.* 1994, Halkman 1999, Pichhardt 2004). Koliform bakterilerin IMViC reaksiyonları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Koliform grubu bakterilerin^a IMViC reaksiyonları (Ünlütürk ve Turantaş 2003)

Koliform Bakteri	İndol Testi	Metil Kırmızısı Testi	Voges-Proskauer Testi	Sitrat Testi
<i>Escherichia coli</i> ; Biyotip 1 (Tipik)	+	+	-	-
Biyotip 2 (Atipik)	-	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ; Tip 1(Tipik)	-	-	+	+
Tip 2 (Atipik)	+	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+	+
Ara tipler (<i>Citrobacter</i>); Tip 1	-	+	- (b)	+
Tip 2	+	+	- (b)	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	- (c)	- (c)	+	+
Düzensiz diğer tipler	d	d	d	d

(a): Bu bakteriler 35-37°C'de laktozdan 48 saat içinde asit ve gaz üretirler.

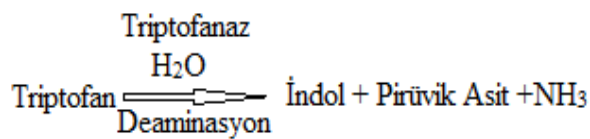
(b): Nadiren zayıf pozitif reaksiyon verenlerine rastlanmaktadır.

(c): Nadiren pozitif sonuç verenlerine rastlanmaktadır.

(d): Değişken

İndol testi

Bu test, mikroorganizmaların triptofanı enzimatik hidrolize uğratarak indol oluşturma yeteneğini belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Aşağıda triptofandan indol oluşum reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 3.5. Triptofandan indol oluşum reaksiyonu

Bunun için izolatların peptonlu suya ekimleri gerçekleştirilerek 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplere 0,5 mL Kovacs ayıracı (Merck) damlatılması sonucu yüzeyde parlak kırmızı halka oluşturanlar indol (+), sarı halka oluşumu gözlenenler ise indol (-) olarak kaydedilmiştir (Pichhardt 2004, Anonim 2011). Şekil 3.6’da indol (+) ve (-) suşlara ait resim verilmiştir.



Şekil 3.6. İndol negatif (sol) ve indol pozitif (sağ) test sonucu

Metil kırmızısı testi

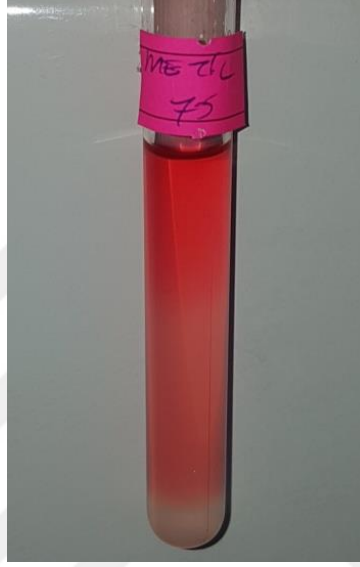
Metil kırmızısı testi, bakterilerin glikozu fermente ederek organik asit oluşturmaları ile ortamın pH’sını düşürme esasına dayanmaktadır. Şekil 3.7’de glikozdan fermentasyonla organik asit oluşumu reaksiyonu verilmiştir.



Şekil 3.7. Glikozdan fermentasyonla organik asit oluşumu reaksiyonu

Glikoz fosfatlı sıvı besiyerine kültürler ekilerek 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüplere metil kırmızısı indikatöründen 5 damla ilave edilerek

karıştırılmıştır. Bu indikatör pH 6,2’de sarı, pH 4,2 ve altında ise kırmızı renk oluşturmaktadır. Dolayısıyla tüplerde gözlenen kırmızı renk pozitif, sarı renk ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Özdemir ve Sert 1996). Şekil 3.8’de 75 numaralı izolata ait metil kırmızısı pozitif test sonucu görülmektedir.



Şekil 3.8. 75 nolu izolata ait Metil Kırmızısı pozitif test sonucu

Voges-Proskauer testi

Bu testin esası bakterilerin glikozu parçalayarak asetoin oluşturma kabiliyetine dayanmaktadır. Böylelikle açığa çıkan asetoin, potasyum hidroksit (KOH) varlığında okside olarak diasetil meydana getirmekte ve bu ürün ise alfa naftol ile muamele edildiğinde kırmızı renk oluşturmaktadır. Bunun için metil kırmızısı testinde olduğu gibi saf kültürden glikoz fosfatlı sıvı besiyerine alınarak tüpler 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüplere 1 mL %40’lık KOH ve 3 mL %5’lik alfa naftol ilave edilmiştir. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 2-5 dakika içinde kırmızı renk oluşumunun gözlenmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Pichhardt 2004). Şekil 3.9’da 1F3 kodlu izolata ait VP pozitif test sonucu görülmektedir.



Şekil 3.9. 1F3 kodlu izolata ait VP pozitif test sonucu

Sitrat testi

Sitrat testi bakterinin karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığının göstergesi olarak uygulanmaktadır. Simmon's sitrat agar besiyeri tüplere aktarıldıktan sonra steril edilerek yatık bir şekilde katılaşmaları sağlanmıştır. Besiyerinin rengi, nötral pH değerinde yeşildir fakat pH 7,6'nın üzerinde koliform üremesine bağlı olarak amonyum tuzlarından alkali üretimi sonucu besiyeri muhteviyatında bulunan brom timol mavisi indikatörü bu yeşil rengi koyu prusya mavisine dönüştürmektedir.

Testin uygulanmasında taze saf kültürlerden iğne yardımı ile bir miktar alınarak sitrat yatık agar besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim sonrası tüpler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüplerde mavi renk oluşumu pozitif (+) reaksiyon olarak değerlendirilirken, orijinal yeşil renk ise negatif (-) sonuç olarak kaydedilmiştir (Pichhardt 2004). Şekil 3.10'da izolatlara ait sitrat (-) ve (+) test sonucu verilmiştir.



Şekil 3.10. İzolatlara ait sitrat negatif (sol) ve sitrat pozitif (sağ) test sonucu

3.2.6. *E. coli* izolatlarının HRM analizi

Numunelerden elde edilen ve -80°C 'de depolanan izolatlar moleküler metotlarda kullanılmak üzere tekrar aktive edilmiştir. İlgili besiyerinde (Nutrient Agar, Merck) gelişen kültürler saflık kontrolünden geçirildikten sonra DNA izolasyonunda kullanılmak üzere steril saf su içerisine alınarak, -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Mevcut *E. coli* bakterilerinin suş seviyesinde farklılıklarını ortaya koymak amacıyla izolasyonu gerçekleştirilen bakteri DNA'ları, V1 ve V3 bölgeleri hedef alınarak HRM analizine tabi tutulmuştur.

3.2.6.a. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu amacıyla -20°C 'de muhafaza edilen kültür solüsyonundan $20\ \mu\text{L}$ alınarak, üzerine $500\ \mu\text{L}$ steril saf su ilave edilip vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Elde edilen bakteri süspansiyonu $5000\times\text{g}$ 'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra fosfat tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Bu işlemlerin ardından, süspansiyon içerisine $0,5\ \text{mL}$ $6\ \text{M}$ üre ve $0,1\ \text{mL}$ $\%10$ SDS ilave edilerek 37°C 'de 20 dakika inkübasyona tabi

tutulmuştur. Daha sonra örnekler 95°C’de 5 dakika bekletilerek, 8000xg’de 25°C’de 10 dakika santrifüj edilip, süre sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan pelletin üzerine 0,1 mL 0,2 N NaOH ilavesi yapılarak 37°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Hücresel parçaların ayrılması maksadıyla 3000xg’de 25°C’de 3 dakika santrifüj işleminden geçirilerek süpernatant kısmı atılmıştır. Saf DNA eldesi için 2,5 hacim absolute (mutlak) alkol ilave edilerek -20°C’de 2 saat bekletilmiştir. Ardından 13200xg’de, 4°C’de, 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilerek %70’lik etanol ile yıkama yapılmıştır. DNA pelleti kuruduktan sonra 20 µl Tris-EDTA (TE) tamponunda tekrar süspanse edilerek PCR işlemi için hazır hale getirilmiştir (Singh and Ramesh 2009). İzole edilen DNA’nın saflığı ve miktarını belirlemek amacıyla nanodrop spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek) cihazı kullanılmıştır. A260/280 oranı bu amaçla kullanılmakta olup, saf DNA örneklerinde bu değer yaklaşık 1,8 olmalıdır. Şekil 3.11’de bazı suşlara ait nanodrop ölçüm sonuçları verilmiştir.

	2	3	
A	SPL1	SPL5	Well ID
			Spectrum
	1,861	1,857	280/280
	83,726	77,997	ng/µL
B	SPL2	SPL6	Well ID
			Spectrum
	1,859	1,851	280/280
	121,286	127,617	ng/µL
C	SPL3	SPL7	Well ID
			Spectrum
	1,841	1,851	280/280
	68,652	56,439	ng/µL
D	SPL4	SPL8	Well ID
			Spectrum
	1,844	1,886	280/280
	87,197	41,005	ng/µL

Şekil 3.11. Bazı suşlara ait nanodrop ölçüm sonuçları

3.2.6.b. Real-Time PCR HRM ile genotiplendirme

Real-Time PCR (RT-PCR) ile genotiplendirme işlemlerinde, suşlar arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla HRM analizine başvurulmuştur. Gerçekleştirilen HRM analizlerinde V1 ve V3 hedef bölgeleri denenmiş olup primerlerin bağlanma sıcaklıkları (T_m), erime değerlerine uygun olacak şekilde seçilmiştir. İlk etapta deneme için seçilen temsili suşların ayrı ayrı hem V1 hem de V3 bölgeleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda *E. coli* suşları için V3 bölgesinin daha uygun olduğu görülmüş ve tüm örnekler 16S rRNA geninin V3 bölgesi dikkate alınarak çalışılmıştır. Aşağıda V3 bölgesi için uygulanan RT-PCR HRM analiz prosedürü sunulmuştur.

RT-PCR HRM için hazırlanması gereken çözeltinin toplam hacmi 13 μ L olacak şekilde; 6,5 μ L EvaGreen PCR Master Mix (Qiagen), 0,5 μ L V3F ve 0,5 μ L V3R primerleri (10 μ M), 50 ng/ μ L Template DNA ve geri kalan kısımda deiyonize su ile tamamlanacak şekilde PCR tüplerine alınmıştır. Hazırlanan örnekler için uygulanan protokolün aşamalarına göre belirlenen süre ve sıcaklık normları aşağıda verilmiştir. Ön deneme amacı ile gerçekleştirilen V1 RT-PCR işleminde bağlanma sıcaklığı 63°C olarak kullanılmıştır.

RT-PCR prosedürü

- 95°C'de 10 dakika; ilk denatürasyon
 - 95°C'de 20 saniye; denatürasyon
 - 58,5°C'de 60 saniye; bağlanma
 - 72°C'de 90 saniye; uzama
 - 72°C'de 10 dakika son uzama
- } 40 siklus

HRM prosedürü

- 70°C'den 95°C'ye 0,1°C/2 sn olacak şekilde tedrici sıcaklık artışı

PCR işlemi tamamlandıktan sonra her bakteriye ait HRM verileri elde edilmiştir (Fukushima *et al.* 2003; Pornprasert *et al.* 2008; Pang *et al.* 2011; Şekerci 2012).

3.2.7. İstatistiksel analizler

Çalışmada kaydedilen veriler SPSS for Windows Release ver. 16.00 paket programı kullanılarak istatistiksel analiz sonuçları elde edilmiştir (SPSS Inc. Chicago, IL. USA). İzolatların PCA (Principal Component Analysis) işlemi ScreenClust software package programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Rotor-Gene ScreenClust HRM Software, QIAGEN, Hilden, Germany).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Mikrobiyolojik Bulgular

Çalışmada Erzurum piyasasından elde edilen 22 adet Beyaz peynir örneği ve süt işletmesinden alınan 25 adet numunede öncelikle TAMB, maya-küf, *S. aureus* ve koliform grubu bakteriler için mikrobiyolojik sayım işlemleri yapılmıştır. Ardından VRB agarda gelişen tipik koloniler *E. coli* izolasyonu için kullanılmıştır. Denemede kullanılan hiçbir örnekte tipik *S. aureus* kolonisine rastlanılmamıştır. Elde edilen kültürel sayım sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Piyasa Beyaz peynir örneklerine ait mikrobiyolojik sayım sonuçları (log kob/g)

Numune	Tekerrür	TAMB	MAYA	KÜF	KOLİFORM
1	1	6,05	< 2	< 2	< 1
	2	6,30	< 2	< 2	< 1
2	1	8,27	2,90	< 2	6,70
	2	8,21	2,85	< 2	6,48
3	1	8,03	4,30	< 2	4,30
	2	8,11	4,3	< 2	4,30
4	1	7,88	< 2	< 2	< 1
	2	7,78	< 2	< 2	< 1
5	1	6,16	2,70	< 2	5,30
	2	6,20	2,60	< 2	5,26
6	1	7,83	2,70	< 2	2,90
	2	7,72	2,78	< 2	2,78
7	1	8,03	4,90	< 2	7,00
	2	8,08	5,00	< 2	6,90
8	1	7,38	5,40	4,48	< 1
	2	7,30	5,34	4,00	< 1
9	1	8,28	< 2	< 2	< 1
	2	8,36	< 2	< 2	< 1
10	1	8,38	3,70	< 2	6,90
	2	8,35	3,68	< 2	6,85

Çizelge 4.1. (devam)

11	1	7,63	3,36	< 2	6,30
	2	7,60	3,40	< 2	6,00
12	1	7,08	2,70	2,70	3,68
	2	7,00	2,60	2,48	3,77
13	1	7,08	3,23	3,04	4,78
	2	7,11	3,18	3,00	4,70
14	1	7,11	3,45	< 2	4,90
	2	7,18	3,48	< 2	4,70
15	1	7,97	< 2	2,70	7,68
	2	7,99	< 2	2,30	7,79
16	1	7,79	5,52	< 2	6,00
	2	7,81	5,54	< 2	6,00
17	1	7,61	3,98	< 2	7,34
	2	7,52	4,30	< 2	7,40
18	1	8,00	< 2	< 2	7,92
	2	7,99	< 2	< 2	7,95
19	1	7,79	4,24	2,48	6,70
	2	7,80	4,30	2,00	6,48
20	1	7,64	4,30	< 2	6,00
	2	7,62	4,00	< 2	6,00
21	1	7,81	5,08	< 2	6,48
	2	7,84	5,11	< 2	6,30
22	1	7,74	3,00	< 2	5,70
	2	7,76	2,90	< 2	5,78
En Küçük		6,05	< 2	< 2	< 1
En Büyük		8,38	5,54	4,48	7,95
Ortalama		7,62	2,97	0,66	4,82

TAMB: Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri

Piyasa örneklerine ait mikrobiyolojik sayım sonuçları (Çizelge 4.1) incelendiğinde; TAMB için en küçük değer 6,05 log kob/g, en büyük değer 8,38 log kob/g, ortalamalarının ise 7,62 log kob/g olduğu görülmektedir. En düşük TAMB değerine sahip 1 numaralı örnek ile 4 ve 9 numaralı numunelerde de TAMB dışında diğer mikroorganizma gruplarına ait verilerin, tespit edilebilir seviyenin altında oldukları anlaşılmaktadır. TAMB için en yüksek değer ise 10 numaralı örneğe aittir.

Elde edilen verilere göre; maya sayım sonuçlarının $<2-5,54$ log kob/g arasında olduğu görülmekte olup, ortalama değeri ise $2,97$ log kob/g seviyesindedir. Sonuçlar incelendiğinde toplam 22 adet peynir örneğinden 4 tanesi dışında tüm örneklerde maya gelişimi görülmüştür. En yüksek değer ise 16 numaralı örneğe aittir.

Beyaz peynir numunelerine ait küf sonuçları $<2-4,48$ log kob/g değerleri arasında değişmektedir. Tespit edilen küf sayımlarının ortalaması $0,66$ log kob/g olarak belirlenmiştir. Piyasaya ait 22 adet peynir örneğinden 8, 12, 13, 15 ve 19 numaralı örnekler haricinde diğer numunelerde küf gelişimi gerçekleşmemiştir. Sayım sonuçlarına göre en yüksek değere 8 numaralı örneğin sahip olduğu görülmektedir.

Koliform grubu bakteri sayısının $<1-7,95$ log kob/g değerleri arasında değiştiği görülmektedir. Toplam 22 adet peynir örneği içerisinde koliform grubu bakterilerin belirlenemediği 1, 4, 8 ve 9 numaralı örneklerin, ulusal firmalara ait olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca 2 ile 6 numaralı numuneler aynı firmanın farklı marka isimleriyle piyasaya sürdüğü örnekler olup; 6 numara kendi ambalajından (teneke) uygun şartlarda alınmış peynir numunesini, 2 numara ise markette belirli gramajlarda satışa sunulması için dilimlenerek streçle kaplanan peynir numunesini temsil etmektedir. Sonuç olarak bu iki numune mukayese edildiğinde 2 numaralı örnekteki TAMB, maya ve koliform yükünün 6 numaraya göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Koliform değeri ortalaması 6 ve 2 numaralı örneklerde sırası ile $2,84$ log kob/g ve $6,59$ log kob/g olarak belirlenmiştir. Tespit edilen değerler marketten alınan peynirin, diğer peynire oranla $3,76$ log kob/g gibi bir mikrobiyal yük fazlalığının olduğunu göstermektedir. Bu durum, satış esnasında uygulanan işlemlerin ürünün mikrobiyal yüküne önemli derecede etki edebildiğini ortaya koymaktadır. Satış noktası uygulamalarında; ilgili personel hijyeni, gıda temas yüzeyleri, uygun olmayan ortam koşulları, kullanılan gereçler gibi olumsuz nedenlerin kontaminasyonun kaynakları arasında olabileceği unutulmamalıdır (Kaynar vd 2005).

Koliform mikroorganizma açısından en yüksek değere sahip olan 18 numaralı örnekte TAMB ve koliform grubu bakterilerin dışında mikroorganizma gelişimi

görülmemiştir. Bu örneğe ait veriler incelendiğinde, VRB agarda gözlenen tipik kolonilerin *E. coli* ön doğrulama işlemleri için EMB'ye çizimleri gerçekleştirilerek, metalik parlak yeşil renkte gelişim gösteren 4 bakteri izole edilmiştir. Ardından uygulanan testler sonucu izolatların gram (-), katalaz (+), oksidaz (-) özellikleri belirlenmiş ve yapılan IMViC test sonuçları (+,+,+,-) şeklinde olup böylelikle dört izolatında Tipik *E. coli* olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra HRM analizinin suş seviyesinde çeşitliliği ortaya koymak için uygulanabilirliğini denemek amacıyla analize tabi tutulan izolatlardan elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucu; 58, 59 ve 60 numaralı suşların sonuçları birbiriyle yakınlık gösterdiğinden aynı suş olabilecekleri, 61 numaralı suşun ise bunlardan farklı olabileceği düşünülmüştür.

Mikrobiyal verilerin korelasyon analizi sonucunda koliform, TAMB ve maya sayıları arasında pozitif bir ilişkinin ($p<0,05$) olduğu görülmüştür. Bu durum genel olarak peynir örneklerindeki mikrobiyal yükün yükselmesi ile koliform grubu bakteri sayılarının da dolaylı olarak arttığı anlamına gelmektedir.

Çizelge 4.2. Aynı süt işleme tesisine ait numunelerin mikrobiyolojik sayım sonuçları

Numune	Tekerrür	TAMB	MAYA	KÜF	KOLİFORM
F1	1	8,87	3,85	< 1	7,89
	2	8,83	3,78	< 1	7,83
F2	1	8,18	4,54	< 1	7,00
	2	8,13	4,51	< 1	6,34
F3	1	8,24	4,68	< 1	6,18
	2	8,20	4,63	< 1	6,11
F4	1	8,91	4,99	< 1	7,26
	2	8,88	4,95	< 1	7,21
F5	1	4,70	2,95	< 1	2,68
	2	4,63	2,93	< 1	2,70
F6	1	7,81	3,85	< 1	6,43
	2	7,78	3,78	< 1	6,54
F7	1	2,41	< 1	< 1	1,00
	2	2,36	< 1	< 1	1,00
F8	1	2,40	< 1	< 1	2,32
	2	2,32	< 1	< 1	2,26

Çizelge 4.2. (devam)

F9	1	2,91	< 1	< 1	< 1
	2	2,88	< 1	< 1	< 1
F10	1	3,38	< 1	< 1	< 1
	2	3,35	< 1	< 1	< 1
F11	1	8,96	5,36	< 2	7,66
	2	8,95	5,26	< 2	7,58
F12	1	8,48	3,60	4,60	2,70
	2	8,44	3,35	4,25	2,60
F13	1	8,60	6,20	< 2	4,90
	2	8,57	6,10	< 2	4,70
F14	1	5,83	5,26	< 2	< 1
	2	5,79	5,18	< 2	< 1
F15	1	6,20	4,78	< 2	2,00
	2	6,18	4,70	< 2	2,00
F16	1	8,26	4,85	< 2	< 1
	2	8,22	4,78	< 2	< 1
F17	1	8,11	5,15	< 2	5,93
	2	8,05	5,09	< 2	5,95
F18	1	6,96	5,66	< 2	5,15
	2	6,94	5,63	< 2	5,05
F19	1	3,04	1,48	< 2	< 1
	2	2,95	1,40	< 2	< 1
F20	1	2,04	3,11	< 2	< 1
	2	2,00	3,04	< 2	< 1
F21	1	4,32	4,00	< 2	< 1
	2	4,30	3,90	< 2	< 1
F22	1	4,54	4,20	< 2	< 1
	2	4,53	4,08	< 2	< 1
F23	1	3,26	3,78	< 2	< 1
	2	3,23	3,70	< 2	< 1
F24	1	5,00	4,18	< 2	< 1
	2	4,99	4,11	< 2	< 1
F25	1	5,32	5,32	< 2	< 1
	2	5,27	5,24	< 2	< 1
En Küçük		2,00	< 1	< 1	< 1
En Büyük		8,96	6,20	4,60	7,89
Ortalama		5,85	3,63	0,17	2,74

Çizelge 4.2 genel olarak incelendiğinde, çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesinin iyi olmadığı ancak hammaddenin ürüne işlenmesi ve uygulanan ısıtma işlemi sonucu mikrobiyal yükün nispeten düştüğü gözlenmektedir.

Beyaz peynir, Kaşar, Civil peynir üretimi yapan bir süt işleme tesisinden bazı hammadde, ürün ve gıda temas yüzeylerinden alınan numunelerdeki mikrobiyolojik sayım sonuçlarına (Çizelge 4.2) bakıldığında TAMB için minimum ve maksimum değerlerin 2-8,96 log kob/g-mL arasında olduğu saptanmıştır. Numunelerdeki TAMB sonuçlarının ortalaması ise 5,85 log kob/g-mL olarak tespit edilmiştir. En yüksek değer F11 numaralı örneğe (kaşar telemesi) ait olup, en düşük değer ise F20 numaralı numuneye (personel eldiven swap 2) aittir. F11 numaralı örnekte TAMB'nin yanı sıra koliform grubu bakterilerin de yüksek seviyede olduğu görülmektedir.

Süt işletmesine ait numunelerde gerçekleştirilen maya sayım sonuçları $<1-6,20$ log kob/g-mL değerleri arasındadır. En yüksek değer yağsız Civil peynirde (F13) görülmekle birlikte kuyu suyu ve şebeke suyunu temsil eden örneklerin (F7, F8, F9, F10) dışında işletmeye ait tüm numunelerde maya gelişimi tespit edilmiştir. Dolayısıyla çiğ süt temininden son ürün elde edilinceye kadar uzanan üretim hattı boyunca hemen her aşamanın ve ortam koşullarının maya gelişimi için müsait olduğu ön görülmektedir. Nitekim hammadde ile başlayıp personellerin eldivenlerinden swap yöntemi ile alınan numunelere, gıdanın temas ettiği; yüzey, alet-ekipman ve ambalaj materyallerinden, son ürün olarak elde edilen çeşitli peynir türlerine kadar alınan 21 örnekte tespit edilen değerlerin bu kanıyı destekler nitelikte olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca işletme sıcaklığı, cendere bezi, salamura suyu gibi etkenlerinde bu durumun devamlılığında önemli parametreler olduğu görülmektedir (Yalçın vd 2011).

Küf gelişimi sadece ambalajlı yağlı Civil peynir örneğinde belirlenmiştir. Bu örnekte gelişen küflerin ise ambalajın deformasyonu sonucu hava almasından kaynaklı olduğu görülmüştür.

Koliform grubu bakterilerin minimum ve maksimum değerlerinin <1-7,89 arasında olduğu saptanmıştır. Toplam 25 örnek içerisinde şebeke suları, ambalaj materyalleri, kaşar kalıpları, personellerin eldivenlerinden alınan svap örnekleri, kaşar ve yağlı Civil numunelerini temsil eden 11 örnekte koliform grubu bakterilerin tespit edilebilir düzeyin altında olduğu ortaya koyulmuştur. Gelişimin gözlemlendiği numuneler arasında en yüksek değerin ise çiğ sütü temsil eden F1 örneğine ait olduğu görülmektedir. Hammaddeden ürüne uzanan üretim hattında özellikle teleme örneklerinde ortalama 10^7 kob/g seviyesine varan koliform bakteri tespit edilmiştir. Teleme ve peynir altı suyunun besinsel bileşimi ve matrikslerinin, mikrobiyal gelişime zemin hazırladığı görülmektedir. Didilmemiş Civil peynir örneğinde (F16) koliform belirlenemezken, didilmiş (tel haline getirilmiş) Civil peynir örneğinde (F15) 2,00 log kob/g düzeyinde koliform değeri tespit edilmiştir. Bu peynir numunelerinin, firmadan diğer numuneleri aldığımız tarihten bir gün önceki üretime ait olduğu dikkate alınarak didme işlemini (tel haline getirme) gerçekleştiren personellerden ya da peynirlerin temas ettiği yüzey gibi etkenlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Sayım sonuçlarına bakılarak, hammadde (çiğ süt) kalitesinin düşüklüğünün üretim hattı boyunca etkili olduğu ve son üründe de kendisini farklı oranlarda gösterdiği anlaşılmıştır (Kaynar 2011).

Çalışmada piyasadan toplanan Beyaz peynir örneklerinden 77 adet, süt işletmesine ait numunelerden ise 45 adet olmak üzere toplamda 122 adet izolat elde edilmiştir. Piyasa örnekleri (Çizelge 4.3) ve aynı işletmeye ait örneklerden (Çizelge 4.4) elde edilen izolatların kaynağı ve kodları aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.3. Piyasa örneklerine ait izolatların kaynağı ve izolat kodları

İzolat Kaynağı	İzolatların Kodu	İzolat Kaynağı	İzolatların Kodu
Numune 1	-	Numune 12	30, 31, 32, 33, 34
Numune 2	1, 2, 3, 4, 5	Numune 13	35, 36, 37, 38, 39, 40
Numune 3	6, 7, 8	Numune 14	41, 42, 43, 44
Numune 4	-	Numune 15	45, 46, 47, 48, 49
Numune 5	9, 10, 11	Numune 16	50, 51, 52
Numune 6	12, 13, 14	Numune 17	53, 54, 55, 56, 57
Numune 7	15, 16, 17, 18, 19	Numune 18	58, 59, 60, 61
Numune 8	-	Numune 19	62, 63, 64
Numune 9	-	Numune 20	65, 66, 67, 68
Numune 10	20, 21, 22, 23	Numune 21	69, 70, 71, 72, 73
Numune 11	24, 25, 26, 27, 28, 29	Numune 22	74, 75, 76

Erzurum piyasasında tüketime sunulan 22 adet Beyaz peynir örneğinden 18'i yerel firmalara aittir. Bu firmaların hepsinden şüpheli *E. coli* bakterilerinin doğrulamasını yapmak üzere izolasyonları gerçekleştirilmiştir. En çok suş 11 ve 13 numaralı örneklerden izole edilmiştir. Fakat elde edilen suşların IMViC ile doğrulanmasında hepsinin *E. coli* olmadığı görülmüştür. 11 numaralı örneğe ait izolatlara uygulanan IMViC testleri sonucu peynirlerde atipik *E. coli* ve *Escherichia* cinsine ait farklı türlerin olduğu da tespit edilmiştir. Aynı şekilde 13 numaralı örnekten elde edilen izolatların da çeşitlilik gösterdiği gözlenmiş olup tipik *E. coli*, atipik *E. coli* ve yine *Escherichia* cinsine ait farklı türler olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3 incelendiğinde koliform grubu bakterilerin tespit edildiği tüm örneklerden en az 3, en fazla 6 izolat elde edildiği görülmektedir. Bu suşlar mümkün olduğunca farklı koloni özelliklerine sahip olanlardan seçilerek izole edilmiştir.

Çizelge 4.4. Aynı süt işletmesinden alınan örneklere ait izolatların kaynağı ve izolat kodları

Hammadde ve Ara Ürünler			Ürünler		
Numune kodu	İzolat Kaynağı	İzolatların Kodu	Numune kodu	İzolat Kaynağı	İzolatların Kodu
F1	Çiğ süt 1	1F1 1F2 1F3 1F4 1F5	F12	Ambalajlı yağlı Civil peynir	7F1 7F2 7F3 7F4
F2	Çiğ süt 2	2F1 2F2 2F3 2F4	F13	Yağsız Civil peynir	9F1 9F2 9F3 9F4
F3	Cendere bezi sıkma suyu	3F1 3F2 3F3 3F4 3F5	F14	Kaşar peynir	-
F4	Teleme suyu (ilk mayalanma)	4F1 4F2 4F3 4F4	F15	Didilmiş (tel haline getirilmiş) yağlı Civil peynir	10F1
F5	Salamura suyu	5F1 5F2	F16	Didilmemiş yağlı Civil peynir	-
F6	Teleme suyu (baskı aşaması)	6F1 6F2 6F3 6F4 6F5			
F7	Kuyu suyu (sistem başı)	-			
F8	Kuyu suyu (sistem sonu)	-			
F9	Şebeke suyu (sistem sonu)	-			
F10	Şebeke suyu (sistem başı)	-			
F11	Kaşar telemesi	8F1 8F2 8F3 8F4 8F5			
Personel Svapları ve Yardımcı Ekipman Yüzeyi					
Numune kodu	İzolat Kaynağı	İzolatların Kodu			
F17	Cendere bezi	11F1, 11F2, 11F3			
F18	Çiğ süt tankı	12F1, 12F2, 12F3			
F19	Personel 1 eldiven svap	-			
F20	Personel 2 eldiven svap	-			
F21	Ambalaj cihazı (üst mekanizma)	-			
F22	Ambalaj cihazı (ambalaj materyali)	-			
F23	Ambalaj cihazı (alt mekanizma)	-			
F24	Kaşar kalıbı 1	-			
F25	Kaşar kalıbı 2	-			

Çizelge 4,4’de sunulan verilere göre; hangi numunelerden izolasyonların yapıldığı görülmektedir. Numuneler arasında sadece F7 ve F8 numaralı örneklerde koliform gelişimi tespit edilmesine rağmen *E. coli* izolatu elde edilememiştir. Firmadan alınan 25 numuneden 45 adet izolat elde edilmiştir. En çok çiğ süttten, en az ise didilmiş Civil peynir örneğinden izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen mikrobiyolojik veriler literatürle kıyaslandığında nispeten benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Örneğin, çalışma verileri Merchan *et al.* (2019)’in Kolombiya yöresel peynirlerinden elde ettiği sonuçlarla mukayese edildiğinde bizim ürünlerimizin nispeten daha yüksek TAMB, daha düşük maya-küf ve koliform sayısına sahip olduğunu göstermektedir. Bu farkların genel olarak 1 log kob/g seviyesinde olduğu tespit edilmiştir.

Saltan Evrensel vd (2003) tarafından Bursa’da gerçekleştirilen benzer bir çalışmada, Beyaz peynir üretimi yapan bir mandıranın üretim hattı boyunca farklı noktalarından numuneler alınarak kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda numunelerde en yüksek 7,32 log kob/g seviyesinde koliform bakterilerin olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar gerçekleştirdiğimiz fabrika çalışması ile mukayese edildiğinde numunelerden elde ettiğimiz en yüksek koliform değeri (7,89) ile aynı logaritmik seviyede olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca çalışmada mikrobiyal sayım sonuçları ele alınarak, işletmenin üretim hattında tespit edilen kritik noktalara değinilip, kontaminasyon kaynakları hakkında çıkarımlara yer verilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada kontaminasyon kaynağını belirlemek maksadıyla moleküler metotlara başvurulmamıştır.

Ulusoy (2004)’a ait bulgular incelendiğinde Ankara’daki çeşitli semt ve marketlerden alınan peynir numunelerinde tespit edilen koliform bakterileri için en düşük değer 3,87 kob/g iken bizim çalışmamızda bu değer tespit edilebilir seviyenin altında olduğu görülmektedir.

Akel (2013) Van piyasasında tüketime sunulan Feta peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen araştırmada çeşitli mikroorganizmalar çalışılmış olup, koliform grubu bakterilerin sayısı 0,78 log kob/g, *E. coli* sayısı ise 0,10 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada Nespolo and Brandelli (2012) tarafından Brezilya’da gerçekleştirilmiş olup, araştırmada koyun sütünden üretilen Feta peynirlerinde koliform değerinin ortalama 1,63 log kob/g, keçi sütünden üretilen peynirlerde ise bu değerin 1,50 log EMS/g seviyesinde olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda yer alan peynirlere ait koliform değerleri, Akel (2013) ve Nespolo and Brandelli (2012) çalışmalarında saptanan koliform seviyelerinden daha yüksek olduğu görülmektedir.

4.2. *E. coli* Suşlarının Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Çalışmada VRB besiyerinde tipik koliform koloni özelliklerinin incelenmesi yapıp, EMB besiyerine çizimleri gerçekleştirildikten sonra şüpheli *E. coli* olarak ön görülen bakterilerin doğrulanması için bazı identifikasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’da mikroorganizmalara uygulanan gram boyama, katalaz, oksidaz ve IMViC sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 4.5. Piyasa peynirlerinden izole edilen koliform bakterilerin bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Numune	İzolat kodu	Gram boyama	Katalaz	Oksidaz	İndol	Metil kırmızısı	Voges proskauer	Sitrat
2	1 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	2 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	3 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	4 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	5	-	-	+	-	+	-	+
3	6 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	7 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	8 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	77 ^b	-	+	-	-	+	-	-

Çizelge 4.5. (Devam)

5	9	-	+	-	-	-	-	+
	10	-	+	-	-	-	-	+
	11 ^a	-	+	-	+	+	-	-
6	12 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	13 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	14	-	+	-	-	-	-	+
7	15 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	16 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	17 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	18 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	19 ^a	-	+	-	+	+	-	-
10	20	-	+	-	-	+	-	+
	21	-	-	+	-	+	-	+
	22	-	+	-	-	+	-	+
	23	-	+	-	-	+	-	+
11	24 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	25	-	+	-	-	-	-	+
	26 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	27	-	+	-	-	+	-	+
	28	-	+	-	-	-	-	+
12	29	-	+	-	-	+	-	+
	30	-	+	-	-	+	-	+
	31	-	+	-	-	+	-	+
	32	-	-	+	+	+	-	+
	33 ^a	-	+	-	+	+	-	-
13	34	-	+	-	-	+	-	+
	35	-	+	-	+	+	-	+
	36 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	37	-	+	-	-	+	-	+
	38 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	39	-	+	-	-	+	-	+
14	40	-	+	-	+	+	-	+
	41	-	+	-	-	+	-	+
	42	-	+	-	-	+	-	+
	43 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	44 ^a	-	+	-	+	+	-	-
15	45	-	+	-	-	+	-	+
	46	-	+	-	-	+	-	+
	47	-	+	-	-	+	-	+
	48	-	+	-	-	+	-	+
	49	-	+	-	-	+	-	+
16	50 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	51 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	52 ^a	-	+	-	+	+	-	-
17	53	-	+	-	-	+	-	+
	54	-	+	-	-	+	-	+
	55	-	+	-	-	+	-	+
	56	-	+	-	-	+	-	+
	57	-	+	-	-	+	-	+

Çizelge 4.5. (Devam)

18	58 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	59 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	60 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	61 ^a	-	+	-	+	+	-	-
19	62	-	+	-	-	+	-	+
	63 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	64 ^b	-	+	-	-	+	-	-
20	65	-	+	-	-	+	-	+
	66	-	+	-	-	+	-	+
	67	-	+	-	-	+	-	+
	68 ^a	-	+	-	+	+	-	-
21	69	-	+	-	-	+	-	+
	70 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	71 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	72 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	73 ^a	-	+	-	+	+	-	-
22	74	-	+	-	+	+	-	+
	75 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	76	-	+	-	-	+	-	+
ATCC 11775		-	+	-	+	+	-	-

a: Tipik *E.coli*b: Atipik *E.coli*

Piyasa örneklerine ait koliform grubu bakterilerin sonuçları incelendiğinde, 77 peynir örneğinde en sık rastlanan tür %49'luk bir oranla *E. coli* (38 adet) iken %51'lik kısmın ise farklı *Escherichia* türlerine ait olabileceği belirlenmiştir. Doğrulaması yapılan *E.coli* türlerinin 29'u (%76) tipik, 9'u (%24) ise atipik olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.5 incelendiğinde 7, 16 ve 18 numaralı peynirlerden izole edilen bakterilerin tümünün tipik *E. coli* olduğu tespit edilmiştir. 3 numaralı numuneye ait koliform bakterilerin ise atipik *E. coli* olduğu belirlenmiştir. Bu analizler neticesinde kolonilerin makroskopik ve mikroskopik özelliklerinin tek başına yetersiz olduğu, mikroorganizmaların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin cins ve/veya tür tanımlamada önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Örneğin, aynı peynirden ekimleri gerçekleştirilen ve VRB'de aynı makroskopik özelliklere sahip olup EMB besiyerinde metalik parlak yeşil renkte koloni gelişimi gösteren 12 ile 14 numaralı bakterilerden biri tipik *E. coli* olarak tespit edilmişken, diğeri farklı bir *Escherichia* türü olarak nitelendirilmiştir. Elde edilen izolatlardan tümünün gram negatif olduğu ve 5, 21, 32 numaralı izolatlar hariç diğer

mikroorganizmaların ise katalaz pozitif, oksidaz negatif özellik gösterdikleri ortaya koyulmuştur.

Çizelge 4.6. Fabrika numunelerinden izole edilen koliform bakterilerin bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Numune	İzolat kodu	Gram boyama	Katalaz	Oksidaz	İndol	Metil kırmızısı	Voges proskauer	Sitrat
Çiğ süt 1	1F1	-	+	-	+	+	+	+
	1F2	-	+	-	-	+	-	+
	1F3	-	+	-	-	+	+	+
	1F4 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	1F5 ^a	-	+	-	+	+	-	-
Çiğ süt 2	2F1 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	2F2 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	2F3 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	2F4	-	+	-	+	+	-	+
Cendere bezi sıkma suyu	3F1	-	+	-	-	+	-	+
	3F2	-	+	-	+	+	-	+
	3F3	-	+	-	-	+	-	+
	3F4 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	3F5	-	+	-	-	+	-	+
Teleme suyu (ilk mayalanma)	4F1	-	+	-	-	+	-	+
	4F2	-	+	-	-	+	-	+
	4F3 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	4F4	-	+	-	-	+	-	+
Salamura suyu	5F1	-	+	-	-	+	-	+
	5F2	-	+	-	-	+	-	+
Teleme suyu (baskı aşaması)	6F1 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	6F2 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	6F3 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	6F4	-	+	-	-	+	-	+
	6F5	-	+	-	+	+	-	+
Ambalajlı yağlı Civil peynir	7F1 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	7F2 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	7F3 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	7F4 ^a	-	+	-	+	+	-	-
Kaşar telemesi	8F1	-	+	-	-	+	-	+
	8F2	-	+	-	-	+	-	+
	8F3 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	8F4 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	8F5	-	-	-	-	+	-	+

Çizelge 4.6. (devam)

Yağsız Civil Peynir	9F1 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	9F2 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	9F3 ^a	-	+	-	+	+	-	-
	9F4 ^a	-	+	-	+	+	-	-
Didilmiş Civil peynir	10F1	-	-	-	-	+	-	+
Cendere bezi	11F1	-	+	-	-	+	-	+
	11F2 ^b	-	+	-	-	+	-	-
	11F3	-	+	-	+	+	-	+
Çiğ süt tankı	12F1	-	+	-	-	+	-	+
	12F2	-	+	-	-	+	-	+
	12F3	-	+	-	-	+	-	+
ATCC 11775		-	+	-	+	+	-	-

a: Tipik *E.coli*b: Atipik *E.coli*

Çizelge 4.6 incelendiğinde, fabrika numunelerine ait izolatların 21'i *E.coli* (%47), kalan 24'ünün (%53) ise farklı *Escherichia* türlerine ait olabileceği tespit edilmiştir. Tanımlanan *E. coli* bakterilerinde 15 (%71) tipik, 6 (%29) atipik tür olduğu saptanmıştır. Koliform grubu mikroorganizmaların çeşitliliği en fazla çiğ süt numunelerinde belirlenmiştir. Teleme örneklerinin tümünde, son ürünlerden ise ambalajlı yağlı Civil ve yağsız Civil peynir numunelerinde *E.coli* kontaminasyonu olduğu tespit edilmiştir. İzolatlar incelendiğinde çiğ sütlerde 5 farklı *Escherichia* türü gözlenirken, mamul üründe ise 2-4 farklı *Escherichia* türünün olduğu tespit edilmiştir.

Konuya ilişkin daha önce gerçekleştirilen bazı çalışmalara aşağıda değinilerek, elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmalar ile mukayese edilip değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Keskin vd (1993) çalışmasında, İstanbul'un semt pazarlarından alınan Beyaz peynir örneklerinin %96'sında koliform bakteri görüldüğü ve %86'sının *E.coli* olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda Erzurum piyasasına ait peynirlerin %82'sinde koliform bakteri tespit edilirken, %49'unun *E. coli* olduğu belirlenmiştir. Sunulan veriler

sonucu, peynir örneklerimizin İstanbul piyasası üzerine gerçekleştirilen mevcut çalışmadaki peynirlerden daha düşük oranda *E. coli* barındırdığı görülmektedir.

Dığrak ve Özçelik (1996) tarafından yapılan araştırmada, Elazığ piyasasına ait Beyaz peynirlerde %42 oranında *E. coli* saptanmış, Şavak peynirlerinde ise bu oranın %32 olduğu bildirilmiştir. Yine Elazığ piyasasındaki Şavak peynirleri üzerine çalışan Tekinşen vd (1993)'nin verileri incelendiğinde %39,5 oranında *E. coli* tespit edildiği açıklanmıştır. Araştırmaların bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla nispeten (%49) yakınlık gösterdiği görülmüştür.

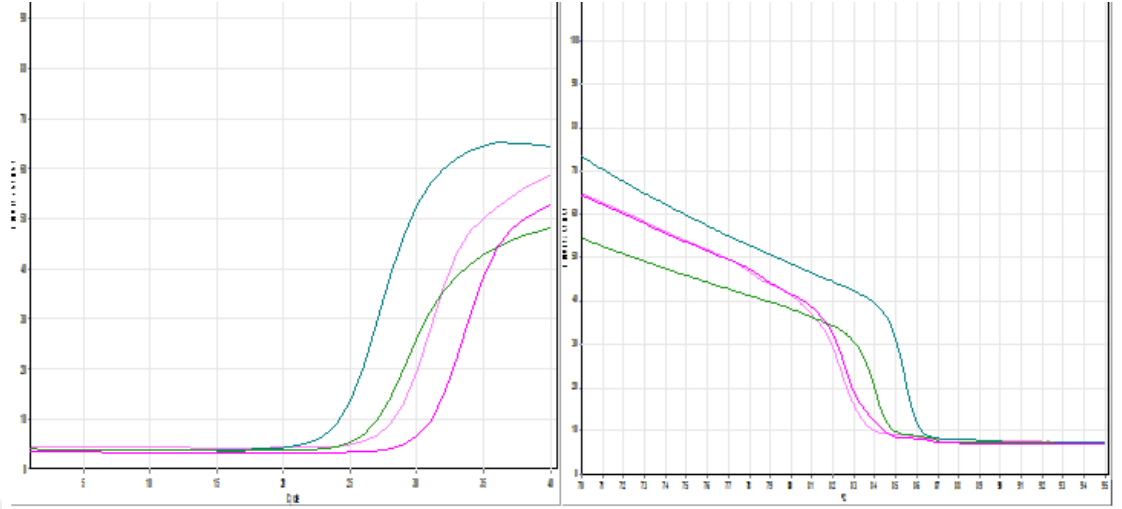
Kasımoğlu (1998) Beyaz peynir üretimi olan modern bir süt işletmesinin üretim aşamasında farklı noktalarından alınan örneklerdeki mikrobiyal yük verileri değerlendirilerek, kontaminasyon kaynaklarının belirlenmeye çalışıldığı araştırmada, peynirlerde 5-6 log kob/g seviyesinde koliform yükü olduğu saptanmıştır. Araştırma sonucu tespit edilen kritik noktalara önerilen önlemlerin uygulanmasından önce peynir numunelerinde görülen bu değer, bizim çalışmamızla uyum göstermektedir.

Sonuç olarak; literatür verileri incelendiğinde piyasa peynirlerinde ve fabrika üretim hattında tespit edilen koliform mikroorganizma yükünün çoğunlukla çalışmalarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ülkemizin çeşitli illerinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda genel olarak işletmelere ait hammadde ve ürün kalitesinin yetersiz olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra üretim aşamasından satış noktalarına varıncaya dek hijyen koşullarının olması gereken seviyede görölmediği çalışmalarla ortaya koymuştur. Peynir üretiminde temin edilen hammaddenin mikrobiyal yükü, ürün kalitesine etki etmekte ve bu sebeple ısıl işlem uygulamalarında inhibe edilmesi amaçlanan mikrobiyal yükün üretimin diğer aşamalarında gerek personel tarafından gerekse gıda temas yüzeyleri, üretimde kullanılan ekipman ve gereçlerden, aynı zamanda satış noktalarının olumsuz koşullarından kaynaklandığı gözlenmiştir.

4.3. PCA ve HRM Analiz Bulguları

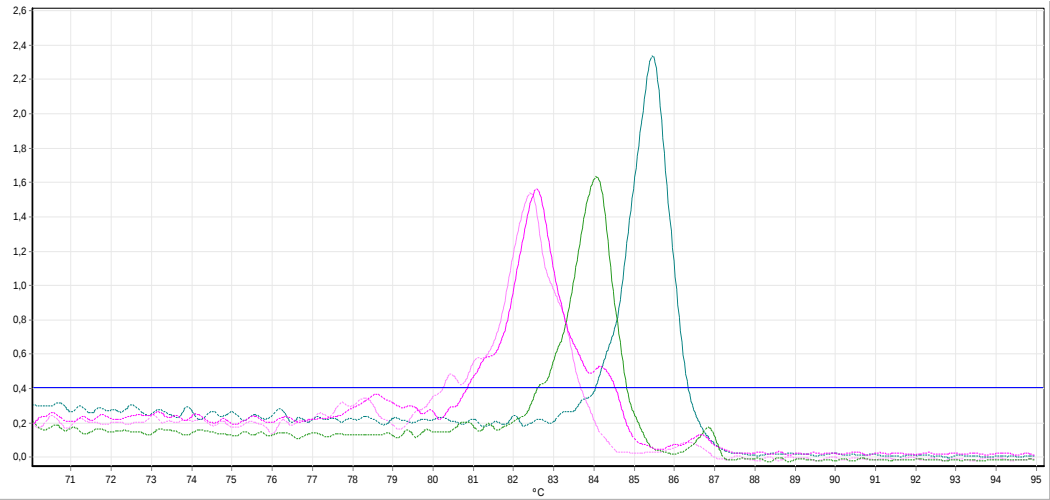
Elde edilen *E. coli* suşlarının farklılıklarını belirleyerek kontaminasyon kaynağının tespit edilmesinde HRM analizi kullanılmıştır. Bu metotta teknik olarak SNP analizi yapabilmekte ve özellikle tıpta mutasyon taramalarında kullanılmaktadır. Real-Time PCR (RT-PCR) cihazı ile gerçekleştirilen bu analizde floresan karakterli EvaGreen boyası kullanılmış ve PCR işleminde amplicon oluşumu grafiksel olarak verilmiştir (Şekil 4.1 (sol)). HRM analizinde uygulanan tedrici ısı artışı neticesinde denatüre edilen DNA'lar boyanın serbest kalmasına sebep olarak piklerde düşüş meydana getirmektedir (Şekil 4.1 (sağ)). Amplicon sekansındaki farklılıklar denatürasyon sıcaklığını özgün kıldığından, metot SNP analizlerinde kullanılabilir. Ancak her ne kadar cihazın deneye özgü oluşturduğu Excel dosyasından denatürasyon noktası tespit edilmeye çalışılsa da özgün denatürasyon sıcaklığının belirlenmesinde HRM eğrisinin türevinin alınması gerekmektedir. Türev grafiğinde spesifik HRM noktası net olarak görülmekle beraber, gürültü (noise) ve spesifik olmayan (non-specific) erime noktalarının elimine edilmesi için eşik seviyesi (threshold) belirlenmesi faydalı olmaktadır (Druml and Cichna-Markl 2014).

Çalışmada 16S rRNA bölgesine ait V1 ve V3 bölgeleri hedef alınarak bir ön deneme gerçekleştirilmiştir. Deneme sonuçları incelendiğinde V3 bölgesine ait piklerin daha keskin ve net olduğu görülmektedir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Ayrıca V3 bölgesi (~300 bp), V1 bölgesine (~100 bp) göre daha fazla baz çifti içerdiğinden daha geniş bir alanda farklılıkları incelemektedir. Diğer bir fark ise Şekil 4.2 ve Şekil 4.4'de görüleceği üzere noise seviyesinin V3'de V1'den daha düşük olmasıdır. Yukarıda sayılan nedenlerden dolayı çalışmaya V3 bölgesi hedef alınarak devam edilmiştir. Şekil 4.1'de V1, Şekil 4.3 de ise V3 bölgesi için ön denemede kullanılan suşlara ait RT-PCR sonuçları (sol) ve HRM grafiği (sağ) verilmiştir. Şekil 4.2'de V1 Şekil 4.4'de ise V3 bölgesi için HRM eğrilerine ait türev piki verilmiştir.



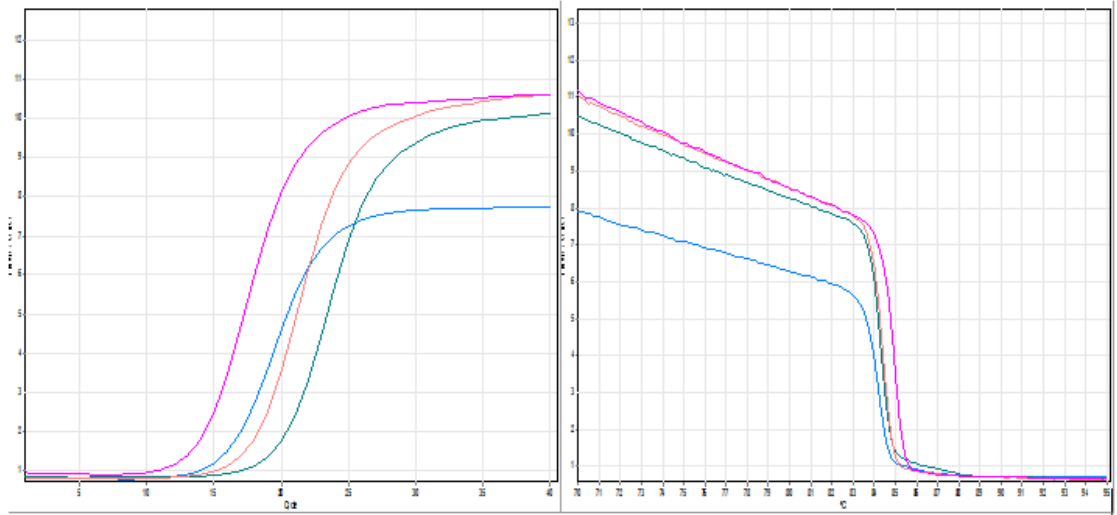
Şekil 4.1. V1 bölgesi için denemede kullanılan suşlara ait RT-PCR sonuçları (sol) ve HRM eğrileri (sağ)

Şekil 4.1’de görüldüğü üzere çalışmada 4 farklı suş seçilerek RT-PCR analizi gerçekleştirilmiş (sol) ardından 70-95°C arasında uygulanan tedrici sıcaklık artışı ile HRM prosedürü uygulanmıştır (sağ). HRM işleminin 80-87°C arasında gerçekleştiği görülmektedir. Şekil 4.1 de iki farklı grafik bir araya getirilerek RT-PCR ve HRM işlemleri sonucu elde edilen eğriler hizalanmaya çalışılarak iki deney arasındaki kuvvetli bağ ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Böylece bu iki işlemin aynı tüpte gerçekleştirilen ardışık prosedürler olduğu gösterilmiştir. HRM işlemi sonucu elde edilen numuneye ait erime sıcaklığının net olarak ortaya koyulmasında türev alma işlemi büyük kolaylık sağlamaktadır. Şekil 4.2’de deneme suşlarına ait V1 bölgesi hedef alınarak elde edilen HRM eğrilerinin türevi görülmektedir. İlgili şekilde kullanılan dört suşun üç farklı grup oluşturduğu net olarak görülmektedir.



Şekil 4.2. V1 bölgesi için ön denemede kullanılan suşların HRM eğrisinin türevi

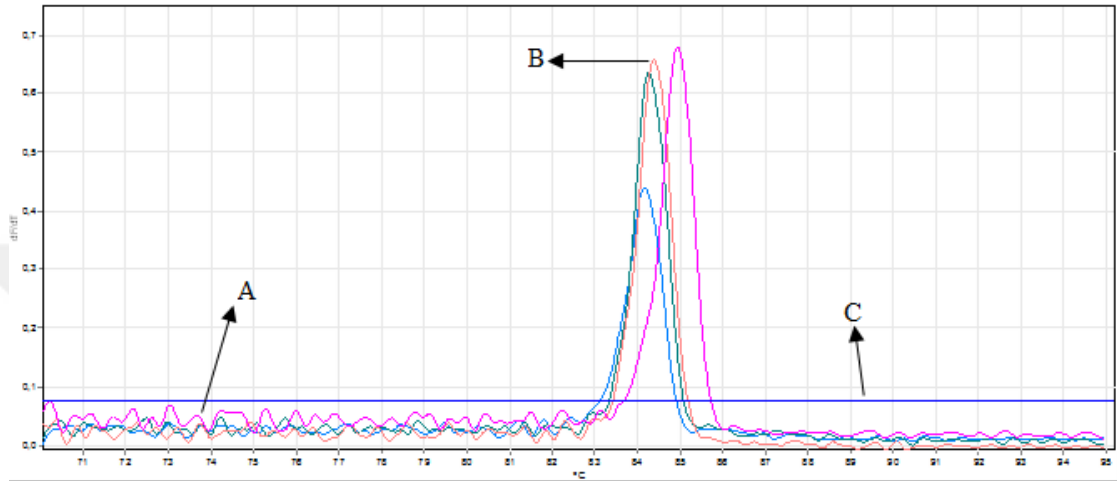
Ön denemede V3 bölgesi hedef alınarak gerçekleştirilen RT-PCR ve HRM eğrilerinin grafiği Şekil 4.3’de verilmiştir. Şekil 4.1’de olduğu gibi burada da suşların grafikleri hizalanmaya çalışılmıştır.



Şekil 4.3. V3 bölgesi için denemede kullanılan suşlara ait PCR sonuçları (sol) ve HRM eğrisi (sağ)

Şekil 4.4’de, yukarıda sunulan HRM eğrilerinin (Şekil 4.3) türev pikleri verilmiştir. Suşlara ait HRM sıcaklığının 83-86°C arasında değiştiği görülmektedir. Ön denemede kullanılan suşlara ait iki türev grafiği incelendiğinde (Şekil 4.2 ve Şekil 4.4) V1

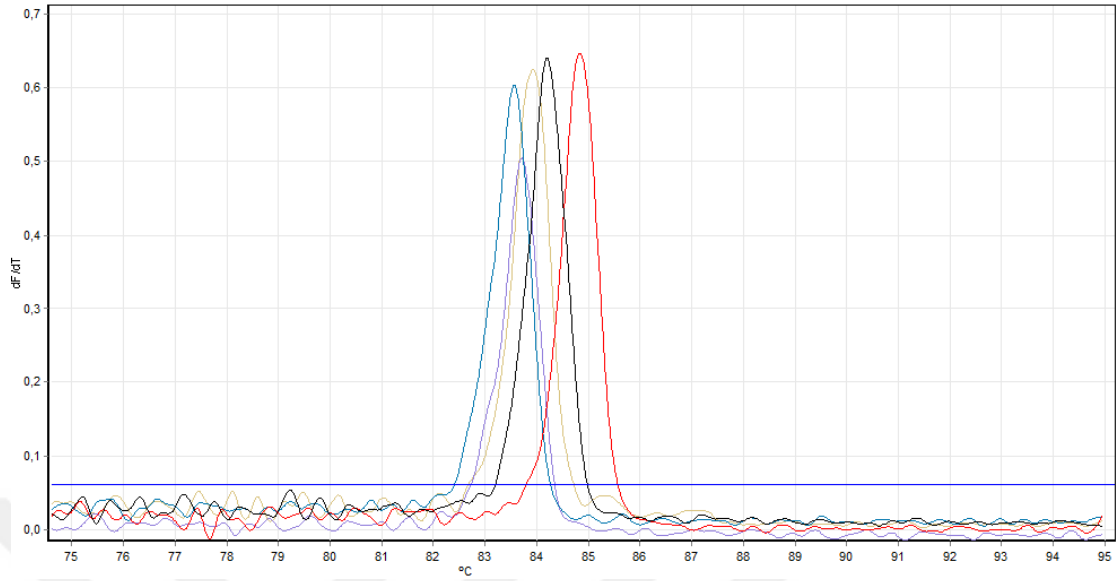
bölgesi için noise (gürültü) seviyesinin 0,4 treshold (eşik seviyesi) çizgisiyle sınırlandırıldığı görülürken, V3 bölgesinde bu değerin 0,1 dF/dT olduğu görülmektedir.



A: noise
B: DNA'nın denatüre olduğu sıcaklık (erime sıcaklığı)
C: treshold

Şekil 4.4. V3 bölgesi için denemede kullanılan suşların HRM eğrisinin türevi

Ön denemenin ardından piyasadan elde edilen suşlar biyokimyasal test sonuçları dikkate alınarak 16S rRNA V3 bölgesi için RT-PCR ve HRM analizine tabi tutulmuştur. HRM analizi sonunda 38 suşa ait erime sıcaklıkları 83,57°C-84,83°C değerleri arasında değişkenlik göstermiştir. HRM eğrileri ve bu eğrilere ait türev pikleri incelendiğinde; HRM sıcaklıkları boyunca belirli bir geçişgenlik görülmekle beraber 0,2°C'lik bir farkın suş ayırımında kullanılabileceği düşünülmüştür. Ohshima *et al.* (2014) tarafından *Listeria* spp. suşlarının ayırımı için gerçekleştirilen bir çalışmada *ldh* geni kullanılarak HRM analizi yapılmış ve *L. monocytogenes* ile *L. welshimeri* için erime sıcaklıkları farkı 0,5°C olarak belirlenmiştir. Türler arasındaki sıcaklık farkının 0,5°C olduğu göz önüne alındığında *E. coli* suşları için belirlenmiş olan 0,2°C'lik sıcaklık farkı anlam kazanmaktadır. İlgili pikler ve grafikler incelendiğinde HRM eğrilerindeki sıcaklık farkları göz önünde bulundurularak 38 suşun 5 gruba ayrılabilirdiği görülmüştür. Bu 5 grup için seçilen temsili suşlara ait türev pikleri Şekil 4.5'de sunulmuştur.



Şekil 4.5. Belirlenen 5 farklı *E. coli* suşunu temsil eden izolatların HRM türev sonucu

Çalışmada kullanılan Rotor-Gene Q Series Software programı ile elde edilen ve HRM eğrilerine ait detaylı Excel dosyasında piklere ait erime sıcaklığı değeri virgülden sonra iki basamak hassasiyetinde görülebilmektedir. Şekil 4.6’da piyasa örneklerine ait beş grubun temsili suşlarının spesifik erime sıcaklıkları verilmiştir.

Melt Curve Results - Melt A....				
No.	C	Name	Genotype	Peak 1
7				84,20
13				83,93
17				83,72
24				83,57
33				84,83

Şekil 4.6. Tespit edilen farklı suşların temsili örneklerine ait spesifik sıcaklık değerleri

Şekil 4.6’da sunulan spesifik erime sıcaklıkları göz önüne alınarak tüm suşlar incelenmiş ve 5 farklı grup olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatlardan üçü için ise tekerrür çalışmalarına rağmen HRM eğrileri ve dolayısıyla türev pikleri elde edilemediğinden gruplandırılmamıştır.

Erime profili DNA'nın uzunluğu ve G+C içeriğine göre değişkenlik göstermektedir. Bu sebeple A+T içeriğinin fazla olduğu bölgelerin daha düşük sıcaklıkta, G+C içeriğinin fazla olduğu bölgelerin ise daha yüksek sıcaklıkta eriyebildiği belirlenmiştir. Ayrıca HRM işleminin SNP belirleme hassasiyeti, PCR ampliconlarının uzunluğuna bağlı olup ≤ 300 bp olan bölgelerin daha hassas sonuçlar verdiği Saeidabadi *et al.* (2017) tarafından bildirilmiştir. Temsili izolatlar Çizelge 4.7'de altı çizili olarak görülmektedir.

Çizelge 4.7. Piyasadan elde edilen *E. coli* suşlarının spesifik erime sıcaklıklarına göre gruplandırılması

Grup	Spesifik erime sıcaklığı (°C)	Benzer erime sıcaklığına sahip suşlar
Grup 1	83,93	1, 2, 8, <u>13*</u> , 52, 58, 60, 61, 64, 68
Grup 2	83,72	11, 16, <u>17*</u> , 19, 43, 44, 51, 59
Grup 3	83,57	15, <u>24*</u>
Grup 4	84,83	3, 4, 6, 12, 18, 26, <u>33*</u> , 36, 38, 71, 72, 73, 75
Grup 5	84,20	<u>7*</u> , 50

Tekerrüre rağmen sağlıklı pik elde edilemeyen suşlar: 63, 70, 77

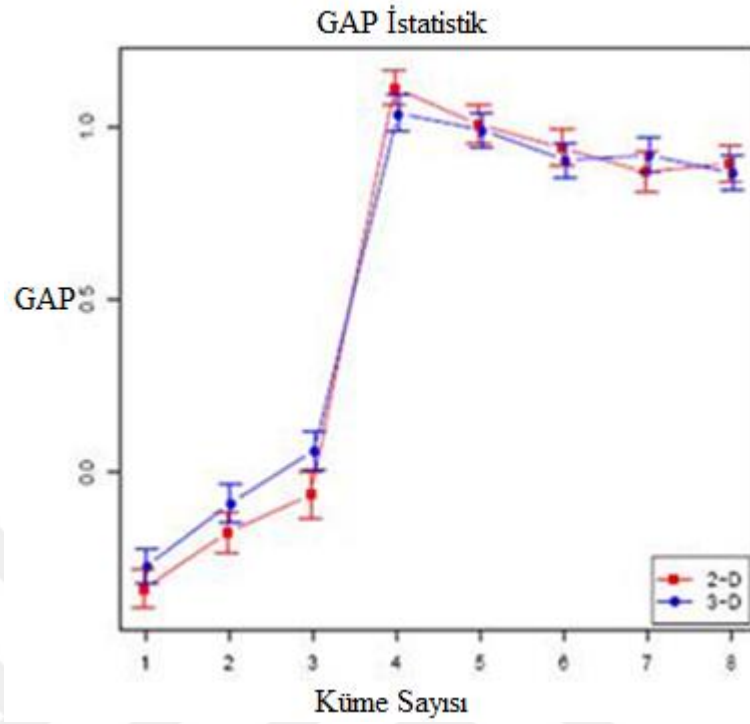
*Altı çizili olanlar temsili suşları ifade etmektedir.

Denemede suşların farklılıklarının tespiti dolayısı ile gruplandırılmaları amacıyla spesifik erime sıcaklıklarından yararlanılmıştır. Ancak çalışmanın tür altı ayrımı gibi oldukça hassas bir mikrobiyal grup için kullanılması ve suşlar arası spesifik HRM değerlerinin yakınlığı sadece erime noktası dikkate alınarak gruplandırma işlemini zorlaştırmaktadır. Haque *et al.* (2016) mutasyon taramaları amacı ile ScreenClust programını kullanmışlardır. Harrison and Hanson (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise patojen *E. coli* suşlarına ait HRM eğrilerinin değerlendirilmesinde PCA kullanımının suşların gruplandırılmasında pratik bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Mikroorganizmalara ait V3 bölgesinin nükleotit dizilimindeki spesifik farklılıklar ScreenClust programı kullanılarak gruplandırılmaya çalışılmıştır (Rotor-Gene ScreenClust HRM Software, QIAGEN, Hilden, Germany). Piyasa örneklerine ait ScreenClust analiz sonuçları Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. ScreenClust programı kullanılarak piyasa suşlarının tiplendirilmesi

Grup sayısı	Benzer erime sıcaklığına sahip suşlar
Grup 1	2, 8, 61, 64
Grup 2	11, 16, <u>17*</u> , 19, 43, 44, 51, 59
Grup 3	15, <u>24*</u>
Grup 4	6, 18, <u>33*</u> , 71, 72, 75, 77
Grup 5	<u>7*</u> , 50
Grup 6	4, 12, 26, 38, 73
Grup 7	3, 36, 63, 70
Grup 8	1, <u>13*</u> , 52, 58, 60, 68

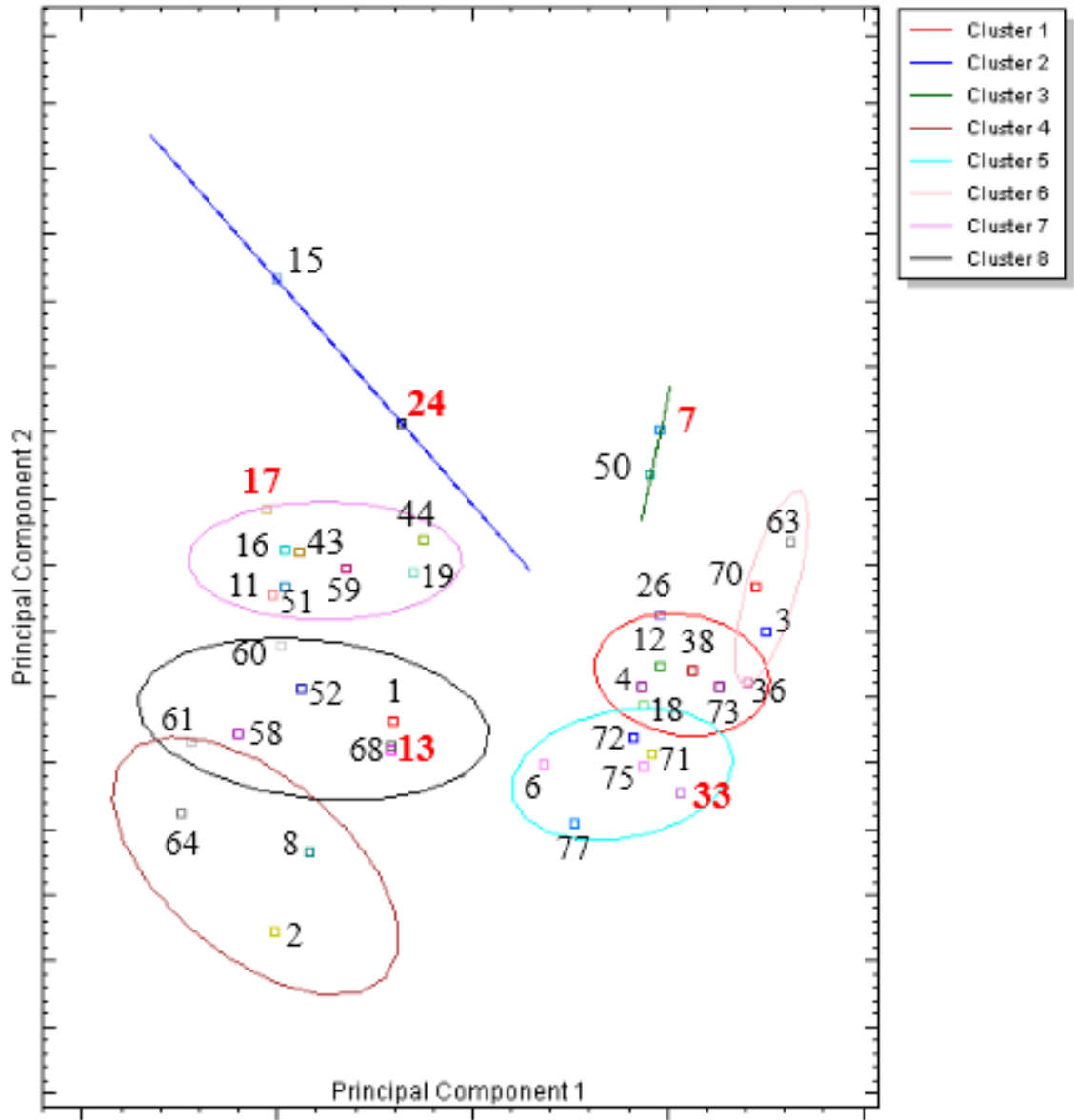
Çizelge 4.8 incelendiğinde spesifik HRM sıcaklıkları dikkate alınarak oluşturulmuş ve sonuçları Çizelge 4.7’de sunulmuş tablodan farklı olarak, ilgili program tarafından fazladan üç grup daha oluşturularak toplamda 8 grup önerildiği görülmektedir. Bu durumda çalışmaya ait verilerin, program tarafından daha detaylı incelenebildiği ve ekstra grupların oluşturulduğu görülmüştür. Çizelge 4.7 ile 4.8 karşılaştırıldığında, programın Grup 1’den farklı suşları ayırarak Grup 8’i oluşturduğu, benzer şekilde Grup 4’den Grup 6’yı ve Grup 7’yi oluşturduğu anlaşılmaktadır. ScreenClust programı HRM verilerine dayanarak PCA yapmakta ve analiz sonucunu gruplandırılmış olarak vermektedir. Program analize tabi tuttuğu veriler için özel bir grafik (GAP Statistic) oluşturmakta bu grafik ile PCA analizi için küme ve boyut değerleri önermektedir. Böylece en uygun gruplandırma işlemi program desteği ile sağlanmaktadır. Şekil 4.7’de PCA ile gruplandırma işleminde kullanılan programa (ScreenClust) ait istatistik grafiği verilmiştir.



Şekil 4.7. ScreenClust programının PCA işlemi öncesi boyut ve küme sayısını öneren GAP İstatistik grafiği

Grafik (Şekil 4.7) incelendiğinde, öncelikle farkın en fazla görüldüğü yer aranarak bunu temsil eden boyut ve küme sayısı tespit edilir. Verilen temsili grafik için 2 boyutlu 4 küme sayısının suşlar arası farkı daha iyi ortaya koyacağı anlaşılmaktadır.

Piyasadan izole edilen *E. coli* suşlarına ait HRM eğrilerinin değerlendirilmesi için gerçekleştirilen PCA ile gruplandırma işleminde, kümeler ve içerdikleri suş kodları Şekil 4.8’de verilmiştir.



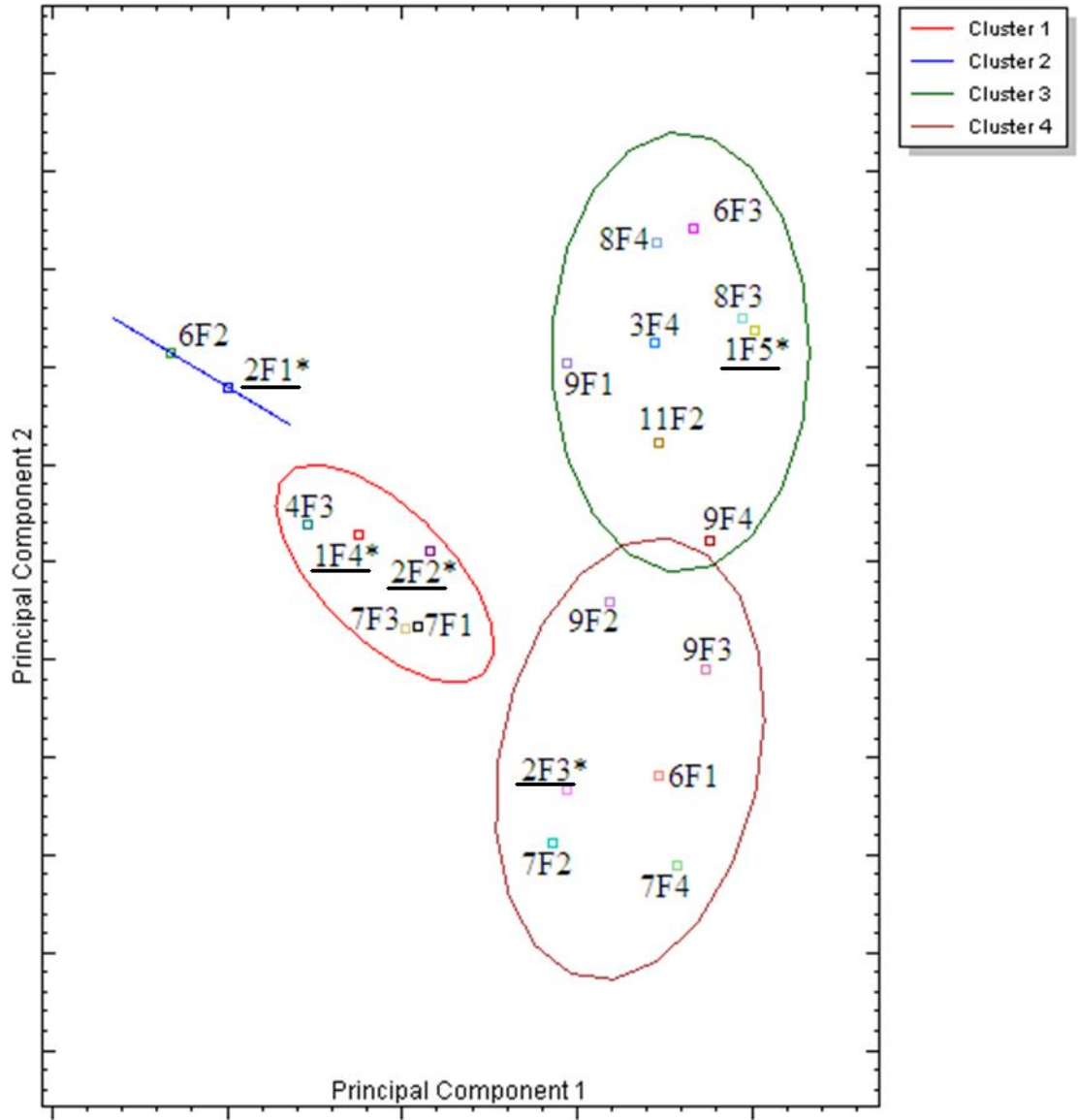
Kırmızı ile yazılanlar HRM sonucu seçilen temsili suşları ifade etmektedir.

Şekil 4.8. Piyasa örneklerine ait *E. coli* suşlarının PCA (Principal Component Analysis) sonucu

Şekil 4.8 incelendiğinde HRM spesifik erime sıcaklıklarına göre yapılan gruplandırmada (Çizelge 4.7) seçilen temsili suşların PCA sonucunda da farklı kümelere ait oldukları görülmektedir. ScreenClust programı ile HRM eğrilerinin spesifik erime sıcaklıkları ile elde edilen beş kümeye ilaveten oluşturulan üç kümede ise sorunlu piklerin toplandığı dikkat çekmektedir. Sonuç olarak program

kullanılmadan önce spesifik erime sıcaklıklarına göre oluşturulan 5 grubun içerdiği suş farklılıklarının, ScreenClust sonucu yapılan kümelendirme işlemiyle tutarlılık gösterdiği ortaya konulmuştur.

Çalışmada piyasa örneklerinden ayrı olarak, aynı işletmedeki farklı ürün ve üretim noktalarından *E. coli* izolasyonu gerçekleştirilmiş ve HRM analizine tabi tutulduktan sonra suşlara ait PCA verileri elde edilmiştir. Şekil 4.9’da aynı işletmeden elde edilen 21 izolatın PCA sonucu oluşturulan kümeleri, içerdikleri suşların kodları ile birlikte verilmiştir. Program kullanımı ile gerçekleştirilen kümelendirme işlemi sonucu fabrika suşlarının 4 farklı grup oluşturduğu görülmektedir.



*Altı çizili izolatlar çiğ süttten edilen *E. coli* suşlarını ifade etmektedir

Şekil 4.9. Fabrika örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının PCA sonucuna ait suş numaraları

Bu sonuca göre “*” ile gösterilen altı çizili izolatların çiğ süt orijinli oldukları (Çizelge 4.4) ve tüm gruplarda temsil edildiği görülmektedir. Bu durum açık bir şekilde çiğ süttün ana kontaminasyon kaynağı olduğunu göstermektedir. Özellikle Çizelge 4.4’de de görülebileceği gibi Civil peynir örneklerinde çiğ süt orijinli *E. coli* kontaminasyonunun devam ettiği görülmektedir. Bu durumda, Civil üretim prosedüründe uygulanan düşük sıcaklık normunun yeterli olmadığı anlaşılmaktadır.

Öte yandan, ısıtma işlemi yeterli şartlarda uygulansa dahi cendere bezinde görülen kontaminasyonun varlığı önemli bir kritik kontrol noktası olarak dikkat çekmektedir.

Gıda sanayiinde ve ürünlerinde kontaminasyon kaynağının belirlenmesine yönelik farklı metotlarla gerçekleştirilen çalışmalar bulunmakla beraber HRM analizi kullanılarak gerçekleştirilen herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Ancak HRM'nin başta tıp olmak üzere gıda alanında ise mikrobiyal farklılıkların tespitinde kullanıldığı görülmektedir (Web of Science 2019). *E. coli* tanısı için HRM yapılan çalışmalar incelendiğinde, genel olarak patojenite genleri hedef alınmış ve HRM'nin *E. coli* suşlarının tespitinde kullanılabildiği belirlenmiştir (Kagkli *et al.* 2012, Harrison and Hanson 2017, Wang *et al.* 2017, Bundidamorn *et al.* 2018, Edwards *et al.* 2018, Williams *et al.* 2019). V3 bölgesi hedef alınarak gerçekleştirilen bu çalışma, yalnızca patojen *E. coli*'leri değil tüm *E. coli* suşlarının tanısında kullanılması ve gıda işletmelerindeki kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi amacı ile diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir.

Erdem *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada, gıda kaynaklı mayaların tanısında ve çeşitliliğin belirlenmesinde HRM analizini kullanmışlardır. İlgili çalışmada maya tanısında ve çeşitliliğin belirlenmesinde spesifik erime sıcaklığının kullanılabileceği vurgulanmıştır. Çalışma sonuçları bu yönüyle bizim verilerimizle kıyaslandığında *E. coli* için de spesifik erime sıcaklıklarının gözlenmesi önemli bir orta nokta olarak görülmektedir.

Kontaminasyon kaynağının belirlenmesinde, mevcut literatür incelendiğinde genellikle mikrobiyal sayım verilerinden sonuca ulaşılmaya çalışıldığı görülmektedir. Griffiths and Phillips (1990), ürünlerde gözlenen psikrofilik *Bacillus* spp. varlığının kaynağını araştırdıkları çalışmalarında üretim hattı boyunca farklı noktalardan örnekler almışlardır. Sayım sonucu en yüksek psikrofilik *Bacillus* spp. değerlerinin görüldüğü süt tankları ana kontaminasyon kaynağı olarak gösterilmiştir. Benzer şekilde Saltan Evrensel vd (2003) bir süt işletmesinde farklı noktalardan elde ettikleri

örneklerden koliform analizi gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri koliform sayılarına göre üretim prosedürlerinde kritik kontrol noktaları tavsiye etmişlerdir.

Fernandes *et al.* (2017), Morina balıklarının orijinlerini tespit etmek amacıyla HRM analizini kullanmışlardır. Dört balık türü için cytochrome c oxidase subunit I (*coi*) ve cytochrome b (*cytb*) genlerini hedef alarak oluşturdukları mini-barcode sistemi ile piyasadaki 30 gıda örneğinde morina balık çeşitliliğini tespit etmişlerdir. Özellikle cytochrome b (*cytb*) mini-barcode sisteminin yüksek hassasiyete sahip olduğunu (%99,3) vurgulamışlardır. İlgili çalışma kullandığı metot açısından bizim çalışmamızla benzer olup HRM metodunun farklı canlılarda farklı genler hedef alınarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Ganopoulos *et al.* (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Feta peynirinin üretiminde kullanılan süt çeşitleri (inek, koyun ve keçi) hakkında bilgi edinmek amacı ile mitokondrial DNA bölgeleri hedef alınarak HRM analizi yapılmıştır. HRM'nin sığır sütünün varlığını (Feta'da izin verilmez) % 0,1'e kadar doğru şekilde belirleyebildiği ayrıca farklı Feta peynirlerindeki koyun ve keçi sütü oranını da doğrulayabildiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, HRM analizinin Feta peyniri de dahil olmak üzere süt ve süt ürünlerinin orijinini doğrulamak ve karışım miktarlarını kantitatif olarak tespit etmek için daha yüksek çözünürlüklü, düşük maliyetli ve hızlı bir yöntem olabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmada HRM metodunun farklı hayvanların sütünü ayırmada da kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Campylobacter jejuni ve *Campylobacter coli* gıda kaynaklı önemli zoonotik patojenlerdir. Özellikle tavuk etlerinde bulunabilen *C. jejuni* ve *C. coli* türlerinin belirlenmesi ve birbirinden ayrılmasında her iki türde de bulunan *cadF* geni hedef alınarak HRM analizi yapılmıştır. Toplam 100 adet tavuk örneğinin kullanıldığı çalışmada 55 numunenin *Campylobacter* ile kontamine olduğu; bunlardan 7 tanesinin *C. jejuni*, 29 tanesinin *C. coli*, 16 tanesinin hem *C. jejuni* hem de *C. coli* içerdiği, 3 tanesinde ise diğer *Campylobacter* türleri olduğu bildirilmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlar HRM analizinin *C. jejuni* ve *C. coli* türlerini birbirinden ayırmada

kullanılabilecek hızlı bir yöntem olduğunu ortaya koyması yönüyle çalışmamız ile benzerlik göstermektedir (Hoseinpour *et al.* 2017).

Costa *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada, hassas kişilerde immünolojik reaksiyonları tetiklemesi yönüyle önemli bir alerjen olan bademin, işlenmiş gıdalardaki içeriğinin hızlı bir şekilde belirlenmesi için HRM analizini kullanmıştır. Çalışmada, çeşitli işlenmiş gıdalarda (bademli çikolata, cevizli kek, kuruyemiş barı, bademli kurabiye vb.) bademde bulunan Pru du 5 alerjen geninin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu yöntemle EvaGreen boyası kullanılarak, işlenmiş gıdalarda bulunan badem miktarının % 0,005 (w/w)'e kadar başarılı bir şekilde tespit edilebileceği belirlenmiştir. Bu çalışma HRM'nin gıda alerjenlerini belirlemede kullanılabileceğini göstermesi açısından önem arz etmektedir.

Salmonella izolatları arasındaki farklılıkların hızlı bir şekilde belirlenmesi amacı ile yapılan bir çalışmada *hemD* geni için spesifik primerler kullanılarak HRM analizi yapılmıştır. Referans olarak 16 farklı *Salmonella* suşu (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Newport* vb.) kullanılmış ve farklı çiftliklerdeki tavuk feçeslerinden 65 *Salmonella* suşu izole edilerek HRM ile gruplandırılmıştır. Bahsedilen suşlar için *hemD* geninin sekansı yapılmış olup, dizilimde nükleotid farklılıkları olan suşlar HRM analizi ile hızlı bir şekilde tespit edilebilmiştir. Fakat *S. Typhimurium* ve *S. Dublin* suşlarında bulunan *hemD* geninde herhangi bir nükleotid farklılığı olmadığından bu suşlar birbirinden ayırt edilememiştir. Çalışma sonucunda *hemD* geni hedef alınarak gerçekleştirilen HRM'ye göre farklı *Salmonella* suşlarının tespit edilebileceği fakat *S. Typhimurium* ve *S. Dublin* için başka bir gen belirlenmesi gerektiği ifade edilmiştir (Saeidabadi *et al.* 2017). Bu çalışma HRM'nin SNP belirlemedeki hassasiyetini sekans ile doğrulayarak ortaya koymuştur.

5. SONUÇ

Çalışmada temel olarak HRM tekniğinin SNP tespitindeki hassasiyetinden yararlanılarak mikrobiyal bulaşmanın kaynağının tespitinde ve suş farklılıklarının belirlenmesinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla ulusal ve yerel ölçekte üretimi gerçekleştirilen 22 Beyaz peynir örneği elde edilerek *E. coli* izolasyonunda bulunulmuştur. Bu izolatlardan oluşturulan kültür koleksiyonu ile metodun kullanılabilirliği test edilmiş ve ön veriler oluşturulmuştur. Ardından yerel bir süt işletmesine ait ürün ve üretim noktalarından 25 adet numune alınarak *E. coli* izolasyonu gerçekleştirilmiş ve kontaminasyon orijini belirlenmeye çalışılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında aşağıda belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır.

1. Piyasadan temin edilen 22 peynir örneğinden 18'inde koliform mikroorganizma belirlenmiş ve bu örneklerden 77 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşların 38'inin yapılan morfolojik, kültürel ve biyokimyasal testler sonucunda *E. coli* olduğu sonucuna varılmıştır. Tez çalışması çerçevesinde elde edilen suşlar sayesinde Beyaz peynir kaynaklı koliform ve özellikle *E. coli* suşları elde edilerek hem mevcut çalışma hemde bundan sonraki çalışmalarda kullanılabilecek ön karakterizasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği bir kültür koleksiyonu oluşturulmuştur.
2. Piyasa örneklerine ilave olarak bir süt işletmesine ait ürün ve üretim hatlarından *E. coli* izolasyonu gerçekleştirilerek proje hipotezi test edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla 25 numunedan elde edilen 45 izolatın kültürel, morfolojik ve biyokimyasal testler sonucu 21'inin *E. coli* olduğu tespit edilerek kontaminasyon kaynağının belirlenmesi amacıyla suşlar HRM analizinde kullanılmışlardır.
3. Çalışmada farklı koliform grubu mikroorganizmalar izole edilmekle beraber tür ve cins seviyesindeki farklılıkların belirlenmesinin spesifik kontaminasyon kaynağının tespitinde sorun olduğu görüldüğünden özellikle *E. coli* üzerinden çalışmalar

yürütülmüştür. Bu amaçla *E. coli*'nin ön tiplendirilmesine özel önem verilmiştir. *E. coli* suşlarının izolasyonu boyunca VRB agardan seçilen tipik koloniler EMB besiyerine çizilmiş ve metalik parlak yeşil koloniler IMViC testine tabi tutulmuştur. IMViC sonuçlarına göre EMB besiyerinde metalik parlak yeşil renkli suşların hepsinin *E. coli* olmadığı, *Escherichia* cinsinin diğer türlerine ait olduğu görülmüştür. Böylece *E. coli* doğrulamasında EMB agarın tek başına kullanımının yeterli olmadığı ve çalışmanın IMViC gibi biyokimyasal testler ile desteklenmesinin daha sağlıklı olduğu ortaya konulmuştur.

4. Deneme sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde tipik koliform kolonilerinin yarısının *E. coli* olduğu, elde edilen *E. coli* izolatlarının ise büyük kısmının tipik özellik gösterdiği biyokimyasal testler ile belirlenmiştir. Özellikle yerel firmalar tarafından üretilen bazı peynir örneklerinin içerdiği yüksek koliform ve *E. coli* değerleri nedeniyle ilgili standartlara uymadığı ve bu peynirlerin tüketiminin halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği tespit edilmiştir.

5. HRM analizinin mikrobiyal çeşitliliğin veya farklılığın belirlenmesi amacı ile kullanılabileceği bu çalışma ile ortaya konulmuş ve analizlerde dikkat edilmesi gereken bazı hususlar tespit edilerek aşağıda sunulmuştur.

a. Her mikroorganizma için tespit edilen spesifik HRM sıcaklığının deney tekrarında farklı rotorlarda nispeten değiştiği görülmüştür. Bu olumsuzluktan etkilenmemek için standart suş kullanımının faydalı olacağı anlaşılmış ve bu amaçla referans olarak *E. coli* ATCC 11775 kullanılmıştır.

b. RT-PCR tekniği çalışma açısından yüksek kalitede DNA izolasyonu gerektirdiğinden özellikle uygun kit kullanımının faydalı olabileceği belirlenmiştir.

c. Deneme boyunca 3 adet piyasa suşundan tekerrürlerine rağmen HRM eğrisi elde edilememiştir. Bu durumun DNA izolasyon kalitesi ile ilgili olabileceği dolayısı ile çalışan kişinin koşullarına bağlı olarak gelişebilecek pipetaj hatası, kontaminasyon gibi faktörlerin minimuma indirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

d. Çalışmada yapılan ön denemeler sonucunda 16S rRNA geninin V3 bölgesi uygun görülmekle beraber deneyin hassasiyetinin artırılması amacı ile farklı genlerin

kullanımının da faydalı olacağı görülmüştür. Özellikle patojen suşlarda virulans genlerinin yüksek değişkenlik gösteren uygun uzunluktaki sekanslarının metodun spesifikliğini artırabileceği düşünülmektedir. Örneğin konu ile ilgili bir çalışmada, *rarA* geni kullanılarak HRM analizi yapılmış ve bu gen için *L. monocytogenes* ile *L. welshimeri* türleri ayırt edilememiştir. Bu türler *ldh* geni hedef alınarak tekrar analize tabi tutulmuş ve 33 izolattan 18'i *L. welshimeri*, 14'ü *L. monocytogenes* olarak belirlenmesine rağmen 1 suş bu iki gen için de gruplandırılmamıştır (Ohshima *et al.* 2014).

6. Çalışmada kontaminasyon kaynağına özgü tür içi mikrobiyal farklılığın belirlenmesinde biyokimyasal testler, spesifik HRM sıcaklığı ve PCA analizi yapılmıştır. Kullanılan bu üç analizin de yararlı veriler sunduğu ortaya konulmuştur. Biyokimyasal testler ile iki, spesifik HRM sıcaklığı ile beş ve PCA analizi ile sekiz farklı gruplandırmanın yapılabilmesi, moleküler metotların kullanımının özellikle ScreenClust gibi istatistik programları ile desteklenmesi durumunda daha faydalı olduğunu göstermiştir. ScreenClust programının optimum kümelendirme önerisinde bulunması ve cihazın ürettiği tüm verileri kullanabilmesi nedeni ile kullanıcı hatalarını minimuma indirerek en ideal ve hassas sonucu verebileceği görülmüştür.

7. Çalışmalar sonucunda HRM metodunun kullanılabilirliği görülmüş olup, sensitivite ve spesifitesinin artırılması için optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulduğuna kanaat getirilmiştir. Bu optimizasyon çalışmalarının farklı gen bölgelerinin denenmesi, DNA izolasyonunda uygun kit kullanımı, tekerrürlü çalışmak ve analizlerde referans suş kullanmak gibi işlemleri içermesi gerektiği tespit edilmiştir.

8. Çalışma sonucundan elde edilen PCA verilerinde belirgin bir şekilde çiğ sütün üretim hattı boyunca işletmedeki kontaminasyonun ana nedeni olduğu görülmüştür. PCA analizinde oluşturulan dört farklı grubun her birisinde çiğ süt kaynaklı *E. coli* suşlarının bulunması bunun en önemli kanıtı olarak görülmektedir. Benzer şekilde cendere bezi sıkma suyu numunesi ve cendere bezinden alınan swap örneklerine ait suşların aynı grupta yer alması da metodun hassasiyetini ve benzer kontaminasyon

kaynaklarının gösterilebilmesi açısından önemlidir. Ayrıca markette belirli gramajlarda satışa sunmak için dilimlenerek paketlenen peynirdeki *E. coli* sayısının, aynı işletmenin orijinal ambalajından (teneke) alınan peynir örneğine göre yaklaşık 10^4 kob/g seviyesinde daha fazla *E. coli* içermesi, satış noktalarında gerçekleşen kontaminasyonda ortaya koymaktadır. Yine işletmeden alınan numunelerde didilmemiş (tel tel ayrılmamış) Civil peynirde koliform tespit edilemezken, didilmiş (tel haline getirilmiş) Civil peynir örneğinden koliform izole edilmesi bu işlemi gerçekleştiren personellerinde kontaminasyonda etkili olduklarını göstermektedir. İşletmeye ait artezyen suyu önemli bir kontaminasyon kaynağı olarak düşünülmüş ancak yapılan analizler neticesinde böyle olmadığı görülmüştür.

9. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde çiğ sütün işletme için önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğu, uygun ısı işlem uygulanmadığında veya çapraz kontaminasyonlar engellenmediğinde üretim hattı boyunca varlığını devam ettirebildiği tespit edilmiştir. Bu durumun moleküler yöntemlerle hassas olarak belirlenmesinin yanında klasik metotlarla da genel olarak belirlenebildiği sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışma neticesinde hijyen açısından kritik kontrol noktalarının belirlenerek titizlikle takibinin önemi ortaya koyulmuştur.

Çalışma sonucunda HRM analizinin işletmede veya ürünlerde kontaminasyon kaynağının belirlenmesinde kullanılabileceği görülmüş olup araştırmanın klasik metotlar ve bilgisayar programları ile desteklenmesi ile detaylı veri elde edilebileceği ortaya koyulmuştur. Metodun SNP tespiti dolayısı ile sunduğu yüksek hassasiyeti, ilk yatırım masrafları karşılandığında sağlayacağı ekonomikliği ve aynı tüp içerisinde PCR ve HRM işlemlerini art arda gerçekleştirebilme kolaylığı ile sağladığı zaman tasarrufu açısından birçok metot ile mukayese edildiğinde avantajlı olduğu görülmektedir. Bununla beraber yaptığımız çalışmalar sonucunda metodun kullanılabilirliği kanıtlanmış olup, sensitivite ve spesifitesinin artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akel, E., 2013. Van'da tüketime sunulan Feta peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Van.
- Alas, Z.T., 2004. Ankara piyasasında tüketime sunulan Beyaz peynir ve sade dondurmada *Listeri amonocytogenes*, *Bacillus cereus*, fekal koliform ve *E. coli* varlığı. Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Anonim 2017a. Yeni bir *E. coli* suşu, Düzen Laboratuvarları Grubu. <https://www.duzen.com.tr/tr/art/204/yeni-bir-e.coli-susu> (06.12.2018).
- Anonim 2017b. Gıda Güvenilirliği Bilgi Formu, 399. https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/Risk%20De%C4%9Ferlendirme%20Hizmetleri/Tuketici_Bilgi_Kosesi/gida_guvenirliligi_brosur.pdf.
- Anonim, 2011. Gıda Güvenilirliği, Ed. Didem Salicik. Gıda gündemi, <http://www.gidagundemi.com/gida-guvenligi/gida-guvenligi/gida-guvenirliligi-h81.html> (15.01.2019)
- Anonymous, 2007. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR). Sequences, [https://genotyping.wordpress.com/2007/03/07/polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr-cok-guclu-bir-teknik/\(08.03.2019\)](https://genotyping.wordpress.com/2007/03/07/polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr-cok-guclu-bir-teknik/(08.03.2019)).
- Anonymous. 2007. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) [Online]. Available: <https://genotyping.wordpress.com/2007/03/07/polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr-cok-guclu-bir-teknik/> [Accessed].
- Arıcan, A. 2008. İki Farklı PH'da Üretilen Yoğurdun 4°C Sıcaklıkta Depolanması Esnasında *Escherichia coli* O157:H7'nin Canlı Kalma Durumunun Araştırılması. Yüksek Lisans, Yüzüncü Yıl Üniversitesi.
- Arslan, S. & Özdemir, F. 2013. Investigation of *Escherichia coli* O157 in turkish homemade white cheese. European Journal of Biology, 72, 45-51.
- Ata, N., 2012. Çine Çaparı ve Karya Koyunlarda Calpastatin Gen Polimorfizminin Pcr-Rflp Yöntemi İle Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootečni Anabilim Dalı, Aydın.
- Aureli P, Di Cunto M, Maffei A, De Chiara G, Franciosa G, Accorinti L, Gambardella AM, Greco D., 2000. An outbreak in Italy of botulism associated with a dessert made with mascarpone creamcheese. European Journal of Epidemiology, 16 (10), 913-918.
- Baker, C. A., Rubinelli, P. M., Park, S. H., Carbonero, F. & Ricke, S. C. 2016. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. Food Control, 59, 407-419.
- Baz, E., Gülmez, M., Güven, A., Sezer, Ç., Duman, B., 2003. Kars İlinde Satışa Sunulan Çiğ Süt ve Taze Beyaz Peynirlerin Koliform Grubu Bakteri, *E. coli* ve *E. coli* O157:H7 Yönünden İncelenmesi. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 9 (2), 165-167.
- Bilginer, H. 2018. Geleneksel Yöntemlerle Üretilen Sirkelerin Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi, Mikrobiyotasında Yer Alan Asetik Asit

- Bakterilerinin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Tanısı. Yüksek Lisans, Atatürk Üniversitesi.
- Bozatl, B. S. 2019. Shiga toksin Üreten *Escherichia coli*'lerin Sosislerde Canlılığının ve Asit Dayanımının İncelenmesi. Doktora Tezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi.
- Bundidamorn, D., Supawasit, W. & Trevanich, S. 2018. A new single-tube platform of melting temperature curve analysis based on multiplex Real-Time PCR using EvaGreen for simultaneous screening detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food. *Food Control*, 94, 195-204.
- Cebeci, O. I., 2013. Süt Teknolojisi-2 Ders Notları. Yalova Üniversitesi, Yalova.
- Cisem, B., 2003. Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria From Cheese. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Institute of Technology, İzmir.
- Cissé, H., Muandze Nzambe, J.U., Somda, N.S., Sawadogo, A., Drabo, S.M., Tapsoba, F., Zongo, C., Traoré, Y., Savadogo, A., 2019. Assessment of safety and quality of fermented milk of camels, cows, and goats sold and consumed in five localities of Burkina Faso. *Veterinary World*, 12(2), 295-304.
- Costa, J., Mafra, I., Oliveira, M.B., 2012. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry*, 133 (3), 1062-1069.
- Çelik, G. 2016. Yoğurdun Yapımı ve Muhafazası Sırasında Shiga Toksin Üreten *Escherichia coli* (STEC) Serogruplarının Yaşamı. Yüksek Lisans, Tunceli Üniversitesi.
- Çetin, B. & Aktaş, H. Determination of Microorganism Differences by High Resolution Melting (Hrm) Analysis in Mixed Cultures. *International Conference on Food, Nutrition and Dietetics, Gastronomy*, 2018 Alanya/Turkey. 233-239.
- Çetin, M. Ş. 2013. Gıdalarda Patojen İndikatörleri. In: Erkmen, O. (ed.) *Gıda Mikrobiyolojisi*.
- Çetin B., Çakmakçı S., Yıldız H., Bilginer H., Tarakçıoğlu F., 2017. Turşu Fermantasyonunda Kullanılabilecek Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi ve Probiyotik Turşu Üretimi için Uygun Suşların Seçimi, Proje Sonuç Raporu. Tübitak, Ankara.
- Çetinkaya, F. & Soyutemiz, G. E. 2006. Microbiological and chemical changes throughout the manufacture and ripening of Kashar: a traditional Turkish cheese. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 397-404.
- Dhakal, R., Chauhan, K., Seale, R. B., Deeth, H. C., Pállidge, C. J., Powell, I. B., Craven, H. & Turner, M. S. 2013. Genotyping of dairy *Bacillus licheniformis* isolates by high resolution melt analysis of multiple variable number tandem repeat loci. *Food Microbiol*, 34, 344-51.
- Dığrak, M., Özçelik, S., 1996. Elazığ'da satışa sunulan peynirlerden izole edilen koliform grubu bakterilerin tanımlanması. *Foods*, 21 (1), 3-7.
- Druml B., Cichna-Markl M., 2014. High Resolution Melting (HRM) Analysis of DNA- Its Role and Potential in Food Analysis. *Food Chemistry*, 158, 245-254.
- Edwards, T., Sasaki, S., Williams, C., Hobbs, G., Feasey, N., Evans, K., Adams, E., 2018. Speciation of common Gramnegative pathogens using a highly multiplexed high resolution melt curve assay. *Scientific Reports*, 8:1114.

- Ekici, K., Okut, H., İsleyici, Ö., Sancak, Y.C., Tuncay, R.M., 2019. The Determination of Some Microbiological and Chemical Features in Herby Cheese. *Foods*, 8 (1), 23.
- Ekinci, Y. F. & Sofu, A. 2013. Hızlı Mikrobiyolojik Gıda Analiz Yöntemleri. In: Erkmen, O. (ed.) *Gıda Mikrobiyolojisi*. Çankaya/Ankara.
- Elkins, K. M., Perez, A. C. & Sweetin, K. C. 2016. Rapid and inexpensive species differentiation using a multiplex real-time polymerase chain reaction high-resolution melt assay. *Anal Biochem*, 500, 15-7.
- Ercolini D., 2004. PCR-DGGE Fingerprinting: Novel Strategies for Detection of Microbes in Food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297-314.
- Erdem, Z., 2011. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Erdem, M., Kesmen, Z., Özbekar, E., Çetin, B., Yetim, H., 2016. Application of high-resolution melting analysis for differentiation of spoilage yeasts. *Journal of Microbiology*, 54 (9), 618-625.
- Erkmen, O., 2010. Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53, 220-235.
- Fernandes, T., Costa, J., Oliveria, M.B., Mafra, I., 2017. DNA barcoding coupled to HRM analysis as a new and simple tool for the authentication of Gadidae fish species. *Food Chemistry*, 230, 49-57.
- Forghani, F., Singh, P., Seo, K.-H. & OH, D.-H. 2016. A novel pentaplex real time (RT)- Pcr high resolution melt curve assay for simultaneous detection of emetic and enterotoxin producing *Bacillus cereus* in food. *Food Control*, 60, 560-568.
- Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A., Madesis, P., Tsiftaris, A., 2013. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. *Food Chemistry*, 141, 835–840
- Griffiths, M., Phillips, J.D., 1990. Incidence source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp found in raw and pasteurized milk. *International Journal of Dairy Technology*, 43 (3), 62-16.
- Guzman-Hernandez, R., Contreras-Rodriguez, A., Hernandez-Velez, R., Perez-Martinez, I., LOPEZ-Merino, A., Zaidi, M. B. & Estrada-Garcia, T. 2016. Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. *Int J Food Microbiol*, 237, 10-16.
- Gonzalez A., Guillamon J.M., Mas A., Poblet M., 2006. Application of Molecular Methods for Routine Identification of Acetic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 141-146.
- Gullo M., Caggia C., De Vero L., Giudici P., 2006. Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Balsamic Vinegar. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 209-212.
- Günel, T. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27, 763-767.

- Haque, M.H., Gopalan, V., Chan, K., Shiddiky, M., Smith, R.A., Lam, A., 2016. Identification of Novel FAM134B (JK1) Mutations in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma. *Nature international journal of science*, 6:29173.
- Harrigan W.F., McCance M.E., 1966. *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press, London and New York.
- Harrigan, W. F. 1998. *Laboratory methods in food microbiology*, Gulf Professional Publishing.
- Harrison, L.B., Hanson ND., 2017. High-Resolution Melting Analysis for Rapid Detection of Sequence Type 131 *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 61 (6), e00265-17.
- Hayaloğlu, A., Güven M., Fox, P. F. 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White Cheese ‘Beyaz Peynir’. *Int. Dairy J.*, 12; 635-648.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T., 1994. *Bergey’s manual of determinative bacteriology* (Ninth Edition), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hoseinpour, F., Foroughi, A., Nomanpour, B., Nasab, R., 2017. Identification and differentiation of *Campylobacter* species by highresolution melting curve analysis. *Microbial Pathogenesis* 108, 109-113.
- Hu, J., Huang, R., Wang, Y., Wei, X., Wang, Z., Geng, Y., Jing, J., Gao, H., Sun, X., Dong, C. & Jiang, C. 2018. Development of duplex PCR-ELISA for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 in food. *Journal of Microbiol Methods*, 154, 127-133.
- Ioanna, F., Quaglia, N. C., Storelli, M. M., Castiglia, D., Goffredo, E., Storelli, A., De Rosa, M., Normanno, G., Jambrenghi, A. C. & Dambrosio, A. 2018. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of Caciocotta goat cheese. *Food Microbiol*, 70, 200-205.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2761-2764.
- Kagkli, D.M., Folloni, S., Barbau-Piednoir, E., Eede, G.V., Bulcke, M.V., 2012. Towards a Pathogenic *Escherichia coli* Detection Platform Using Multiplex SYBRGreen Real-Time PCR Methods and High Resolution Melting Analysis. *Plos One*, 7(6), e39287.
- Kanber, G., 2014. Mastitisli İneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Karacan, G., 2013. Türkiye’deki *Apodemus mystacinus* (Mammalia: Rodentia)’Un Mtdna (Sitokrom B Ve Kontrol Bölgesi) RFLP ve DNA Dizi Analizi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Karahan, A.G., Arıdoğan, B.C., Çakmakçı, L. 2002. “Genel Mikrobiyoloji”. Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 24. 171 s.
- Karasu Yalçın, S., Şenses Ergül, Ş., Özbaş, Z.Y., 2011. Peynir mikroflorasındaki mayaların önemi. *Gıda*, 36 (1), 55-62.
- Kasımoğlu, A., 1998. Beyaz peynir üretim aşamasında kontaminasyonların belirlenmesi ve önleme yollarının araştırılması. Doktora Tezi, Ankara

- Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni Ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.
- Kaynar, P., 2011. Ülkemiz Peynirleri Üzerine Mikrobiyolojik Araştırmalar. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 41 (1), 1-8.
- Kaynar, Z., Kaynar, P., Koçak, C., 2005. Ankara Piyasasında Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerin Hijyenik Kalitelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 62 (1), 1-10.
- Keskin, Y., Özyaral, O., Başkaya, R., Susur, M.A., 2006. Semt pazarlarında satılan Beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 36 (1), 9-19.
- Kıran, F., Ağaoğlu, F., 2011. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/ Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74.
- Law, J. W.-F., AB Motalib, N.-S., Chan, K.-G. & Lee, L.-H. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Liu, L., Liu, J., Huang, H., Li, Y., Zhao, G. & Dou, W. 2019. A quantitative foam immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on bimetallic Nanocatalyst-gold platinum. *Microchemical Journal*, 148, 702-707.
- Liu, Y., Singh, P. & Mustapha, A. 2018. Multiplex high resolution melt-curve real-time PCR assay for reliable detection of Salmonella. *Food Control*, 91, 225-230.
- Lomonaco, S., Nucera, D., Parisi, A., Normanno, G., Bottero, T., 2011. Comparison of two AFLP methods and PFGE using strains of *Listeria monocytogenes* isolated from environmental and food samples obtained from Piedmont, Italy. *International Journal Of Food Microbiology*, 149 (2), 177-182.
- Mandal, P., Biswas, A., Choi, K. & PAL, U. 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *American Journal Of Food Technology*, 6, 87-102.
- Maturin L.J. and Peeler J.T., 1998. Aerobic Plate Count, (Chapter 3), *Bacteriological Analytical Manual (BAM, 8th Edition)*, Food And Drug Administration, Gaithersburg, MD, USA.
- Merchán, N., Zurymar, S., Niño, L., Urbano, E., 2019. Determination of the microbiological safety of artisanal cheeses according to Colombian technical standards. *Revista Chilena de Nutrición*, 46(3), 288-294.
- Miszczucha, S. D., Thevenot, J., Denis, S., Callon, C., Livrelli, V., Alric, M., Montel, M. C., Blanquet-Diot, S. & Thevenot-Sergentet, D. 2014. Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. *Int J Food Microbiol*, 172, 40-8.
- Ohshima, C., Takahashi, H., Phraephaisarn, C., Vesaratchavest, M., Keeratipibul, S., Kuda, T., Kimura, B., 2014. Establishment of a Simple and Rapid Identification Method for *Listeria* spp. by Using High Resolution Melting Analysis and Its Application in Food Industry. *Plos One*, 9 (6), e99223.
- Özdemir, S. ve Sert, S., 1996. Gıda Mikrobiyolojisi Tatbikat Notları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 128, Erzurum.

- Pestana E.A., Belak S., Diallo A., Crowther J.R., Viljoen G.J., 2010. Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics-Real Time PCR Applications. Springer, Dordrecht, Holland.
- Pichhardt, K., 2004. Gıda Mikrobiyolojisi (Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar). Literatür Yayıncılık, İstanbul.
- Porcellato, D., Gronnevik, H., Rudi, K., Narvhus, J. & Skeie, S. B. 2012. Rapid lactic acid bacteria identification in dairy products by high-resolution melt analysis of DGGE bands. Lett Appl Microbiol, 54, 344-51.
- Priyanka, B., Patil, R. K. & Dwarakanath, S. 2016. A review on detection methods used for foodborne pathogens. The Indian journal of medical research, 144, 327-338.
- Punoo, H.A., Patil, G., Singh, R., 2018. Physico-chemical and microbiological composition of Kradicheese. Indian Journal of Dairy Science, 71 (2), 152-155.
- Ray, B. & Bhunia, A. 2013. Fundamental food microbiology, CRC press.
- Redondo, C., Cubero, J., Melgarejo, P., 2009. Characterization of *Penicillium* Species by Ribosomal DNA Sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR Analysis. Mycopathologia, 168, 11-22.
- Rodríguez-Lázaro, D. 2013. Real-time PCR in food science: current technology and applications, Norfolk, UK, Horizon Scientific Press.
- Rudi, K., Kleiweg, G. H., Heiweg, R. & Rosnes, J. T. 2007. Rapid identification and classification of bacteria by 16S rDNA restriction fragment melting curve analyses (RFMCA). Food Microbiol, 24, 474-81.
- Saeidabadi, M., Nili, H., Dadras, H., Sharifiyazdi, H., Connolly, J., Valcanis, M., Raidal, S., Ghorashi, A.S., 2017. Evaluation of PCR and high-resolution melt curve analysis for differentiation of *Salmonella* isolates. Taylor & Francis, 46 (3), 319-331.
- Saltan Evrensel, S., Temelli, S., Anar, Ş., 2003. Mandıra düzeyindeki işletmelerde Beyaz peynir retiminde kritik kontrol noktalarının belirlenmesi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27 (1), 29-35.
- Sert, S., 2011. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Notları (Üçüncü Baskı). Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders Yayınları No:138.
- Sofu, A., 2009. Çeşitli Peynirlerdeki Bakteriyel Ekosistemin PZR-DGJE Yöntemi Kullanılarak Mikrobiyal Biyoçeşitliliğinin Tanımlanması. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Speck, M.L., 1984. Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods. American Public Health Association, Washington.
- Taşkan, E., 2013. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde Farklı Kirlleticilere Göre Elektrik Üretim Kapasitesi ve Mikrobiyal Tür Değişiminin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Tekinşen, O.C., Patır, B., Alkan, M., 1993. Şavak peynirinde koliform grubu mikroorganizmalar üzerine araştırmalar. Eurasian Journal Of Veterinary Sciences, 9 (2), 8-12.
- Torun, Ö. 2011. Gıda Örneklerinde ve Sularda *Escherichia coli* Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi.
- Trcek J., Ramus J., Raspor P., 1997. Phenotypic Characterization and RAPD-PCR Profiling of *Acetobacter* sp. Isolated from Spirit Vinegar Production. Food Technology and Biotechnology, 5, 63-67.

- Turan, B. 2012. İstanbul İli Sınırları İçinde Satışa Sunulan Sebze Örneklerinde *Escherichia coli*'nin Real-Time PCR Yöntemi İle Shiga Benzeri Toksin Genleri Varlığı Bakımından İncelenmesi. Yüksek Lisans Yüksek Lisans, İstanbul Aydın Üniversitesi.
- Turgay, Ö. 2013. Geleneksel Mikrobiyolojik Gıda Analiz Yöntemleri. In: Erkmen, O. (ed.) Gıda Mikrobiyolojisi. Çankaya/Ankara.
- Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, 29.12.2011-28157
- Ulusoy, H., 2004. Çiğ süt ve peynir örneklerinde koliform grubu mikroorganizma/*E. coli* ile birlikte *Y. enterocolitica* izolasyonu. Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Ünlütürk, A. & Turantaş, F. 1998. Gıda mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, İzmir, 605.
- Ünlütürk A. ve Turantaş F., 2002. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi, Meta Basın Matbaacılık Hizmetleri, İzmir.
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Cocconcelli, P. S. & Trevisan, M. 2012. Soil Bacterial Diversity Screening Using Single 16S rRNA Gene V Regions Coupled with Multi-Million Read Generating Sequencing Technologies. PLOS ONE, 7, e42671.
- Vegas C., Gonzalez A., Mateo E., Mas A., Poblet M., Torija M.J., 2013. Evaluation of Representativity of The Acetic Acid Bacteria Species Identified by CultureDependent Method During A Traditional Wine Vinegar Production. Food Research International, 51, 404-411.
- Walls, H., Baker, P., Chirwa, E. & Hawkins, B. 2019. Food security, food safety & healthy nutrition: are they compatible? Global Food Security, 2211-9124.
- Wang, W., Zijlstra, RT, Gänzle, M., 2017. Identification and quantification of virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* by high-resolution melting curve quantitative PCR. BMC Microbiology 17:114.
- Web of Science, 2019. Contamination, detection, food, HRM. http://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=D1dtsYZUJbsdH7xOID3&errorQid=7#searchErrororMessage (24.07.2019)
- Wei, Q., Wang, X., Sun, D.-W. & PU, H. 2019. Rapid detection and control of psychrotrophic microorganisms in cold storage foods: A review. Trends in Food Science & Technology, 86, 453-464.
- Williams, C., Musicha, P., Feasey, N., Adams, E., Edwards, T., 2019. ChloS-HRM, a novel assay to identify chloramphenicol-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Malawi. 74: 1212-1217.
- World Health Organization, 2008. Safer water, better health Report. Available at: http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/saferwater/en/.
- Zhang, J., Wang, J., Zhang, X. & He, F. 2018. Rapid detection of *Escherichia coli* based on 16S rDNA nanogap network electrochemical biosensor. Biosens Bioelectron, 118, 9-15.
- Zorba, N. N. 2013. Gıda Kaynaklı İnvaziv Enfeksiyonlar. In: Erkmen, O. (ed.) Gıda Mikrobiyolojisi.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Erzurum’da doğdu. Eğitim hayatına Sabancı İlköğretim Okulu’nda başlayıp, Tevfik İleri Anadolu Lisesi’nde devam etmiştir. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’ne başlamış ve 2014 yılında mezun olmuştur. Toplu yemek üretimi gerçekleştirilen kurumlarda çalışma hayatına başlayıp aynı zamanda Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda, Yüksek Lisans eğitime hak kazanmıştır. Gıda Mikrobiyolojisi alanında yürüttüğü Yüksek Lisans eğitimini 2019 yılında tamamlamıştır.