



Aydın İlinde Tüketime Sunulan Marullarda *E. coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması

Nalan Turgut^{1*}, Osman Kaya¹

^{1*} Nalan Turgut, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye, ORCID: 0000- 0001- 5099-5024), ncubukcu@gmail.com

¹ Osman KAYA, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye, okaya@adu.edu.tr

(İlk Geliş Tarihi 5 Temmuz 2022 ve Kabul Tarihi 29 Ağustos 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1141099)

ATIF/REFERENCE: Turgut, N., Kaya, O. (2021). Aydın İlinde Tüketime Sunulan Marullarda *E. coli* O157:H7 Varlığının Araştırılması. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (38), 507-513.

Öz

Bu çalışmada Aydın ilinde bulunan semt pazarlarından ve marketlerden alınan marul örneklerinde ilk kez *Escherichia coli* O157:H7 varlığı araştırılmış, izolasyon ve identifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Toplum sağlığı açısından önemi olan *E. coli* O157:H7'nin gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalardan birisi olması sebebiyle, söz konusu patojenin yaygınlığı ve bulaşıklık durumu ile benzer iklim özelliklerine sahip olan bölgeler için önemli bir veri kaynağı oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında semt pazarlarından ve marketlerden alınan toplam 100 adet marul örneklerinin izolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucunda örneklerin tümünden toplam 17 (%17) adet *E. coli* O157:H7 izole ve teşhisi yapılan, patojenlerin 12 (%12) adedi pazarlardan, 5 (%5) adedi ise marketlerden alınan örneklerden elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda pazar ve marketlerden satın alınan marul örnekleri *E. coli* O157:H7 varlığı açısından risk teşkil ederken konu ile ilgili olarak yetiştirme, gübreleme, sulama, taşıma ve depolama aşamalarında bulaşmayı engelleyici önlemlerin alınması gerektiği konusu vurgulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *E. coli* O157:H7, marul, kontaminasyon.

Investigation of *E. coli* O157:H7 Presence in Lettuce Served for Consumption in Aydın Province

Abstract

In this study, the presence of *Escherichia coli* O157:H7 was investigated for the first time in lettuce samples taken from the neighborhood markets and markets in Aydın, and isolation and identification studies were carried out. Since *E. coli* O157:H7, which is important for public health, is one of the food-borne pathogenic microorganisms, it is aimed to create an important data source for regions with similar climatic characteristics with the prevalence and contamination status of the pathogen. As a result of isolation and identification studies of 100 lettuce samples taken from neighborhood markets and markets, a total of 17 (17%) *E. coli* O157:H7 samples were isolated and identified from all samples, 12 (12%) of pathogens were from markets, 5 (5%) were obtained from samples taken from the markets. In line with the results obtained, it was stated that while the lettuce purchased from markets and markets poses a risk in terms of the presence of *E. coli* O157:H7, it is stated that preventive measures should be taken in the stages of cultivation, fertilization, irrigation, transportation and storage.

Keywords: *E. coli* O157:H7, lettuce, contamination.

1. Giriş

İnsan beslenmesinde taze sebze ve meyve tüketimi, vitamin ve mineral değerleri bakımından zengin olmaları nedeniyle önemli bir yere sahiptir (Yücel ve Halkman, 2009). Minimal işlem görmüş sebze ve meyvelerin tüketimi gelişmiş toplumlarda oldukça yaygın iken, gelişmekte olan ülkelerde ise taze olmaları ve erişilebilirliklerinin kolay olması ve fiyatının uygun olması bakımından tercih edilmektedirler (Chaudry ve ark., 2004). Ancak sebze ve meyve tüketimindeki artışla beraber bu tip gıdalardan kaynaklanan salgınlarda artış göstermekte ve özellikle az işlem görmüş ya da herhangi bir işlem görmemiş bu besinlerin çiğ olarak tüketilmeleri, patojen mikroorganizma ile bulaşık iseler insan sağlığı açısından ciddi tehdit oluşturmaktadır (Johannessen ve ark., 2002; Gündüz, 2008). Gıda kaynaklı olarak nitelendirilen hastalık ve patojenlerin spektrumu geçmiş yıllara kıyasla önemli ölçüde genişlediği için yaşanan patojen salgınları, halkın dikkatini gıda güvenliği konusuna çekmekte ve yapılan araştırmalarda da tüketim için hazır sunulan gıdalarda *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenlerin var olduğu belirtilmiştir. Bu tip gıdalarda patojen varlığına; gıda hammaddelerinde mikroorganizma yükünün fazlalığı, yetersiz ısı işlem, kontamine olmuş malzemeler, yetersiz muhafaza koşulları, yetersiz işletme hijyeni, çapraz kontaminasyon ve konu ile ilgili yeterli bilgiye sahip olmayan personelin neden olduğu belirtilmektedir (Öğüt ve Polat, 2009).

Sözü edilen patojenler arasında insanlar açısından önemli bir fırsatçı patojen olarak görülen *Escherichia coli*, genel olarak bakteri biyolojisinin araştırılması adına üzerinde en fazla çalışılan ve hakkında en fazla şey bilinen organizma olarak kabul edilmektedir. Enterobacteriaceae familyasına ait bir türdür ve normal bağırsak florasına ait olduğu içinde patojen mikroorganizmaların bağırsaklarda kolonizasyonunu engeller. *E. coli*'nin kalın bağırsak florası içinde bulunan yaygın bir tür olması ile bu durum onu pek çok bakteriyel enfeksiyondan da sorumlu tutmaktadır. Üriner yol enfeksiyonu, bağırsak enfeksiyonları ve bağırsak dışı enfeksiyonlar (pnömoni, menenjit, bakteriyemi) yaşanmaktadır (Ustaçelebi,1999). Gastrointestinal patojenik *Escherichia coli*, Enteropatogenik *E. coli* (EPEC), Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteroinvazif *E. coli* (EIEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) içermektedir. *E. coli* türleri arasında gıda kaynaklı hastalıkların sıklığı ve hastalık şiddetine göre en önemli grup olarak kabul edilen EHEC grubuna odaklanılmaktadır ve Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) bilinen *E. coli* tipleri içerisinde en önemlisi olup, ölümle sonuçlanan pek çok gıda kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu olan O157:H7 serotipini içermektedir (Meng ve ark., 2012). *Escherichia coli* O157:H7 serotipi, shiga benzeri toksin salgılayan, çubuk şekilli, gram negatif bakteriler olup *E. coli* bakterisinin yüzlerce serotipinden birisidir. Çoğu suş zararsız olup sağlıklı insanların ve hayvanların bağırsaklarında yaşarlar ancak bu serotipi oluşturan suşlar güçlü bir toksin salgılar ve ağır seyreden hastalığa neden olurlar. *E. coli* O157:H7 serotipinin kaynağı olarak özellikle sığırların rolünün etkin olduğu belirtilirken aslında sığır etinde bu bakteriye rastlanmaz fakat enfekteli bir sığır dışkısı veya bağırsakla temas eden ette hastalığın bulaşması ile ilgili risk oluşmaktadır. Meydana gelebilecek enfeksiyonlarda sığırlar birinci derecede risk grubunda yer alırken sığırların dışındaki diğer hayvanlar ise vektör görevi görmektedirler (Chapman ve ark., 1993).

Sineklerin *E. coli*'yi taşıyabildiği ve temiz alanlara aktarabildiği bir çalışmada belirtilmiş olup sığır besi yeri yakınında yaprağı tüketilen sebzelerin yetiştirildiği tarlalardan haşere sineklerinin *E. coli* O157:H7'yi 180 m kadar uzağa taşıyabildiği ve sineklerin yeşil yapraklı bitkilerin kontaminasyonu için bir araç olabildiği belirtilmiştir (De Jesus ve ark., 2004; Berry ve ark., 2019).

ABD'nin farklı eyaletlerinde marul ve ıspanak tüketiminin ardından meydana gelen gastroenterit salgınlarda *E. coli* O157:H7 sorumlu tutulmuş olup taze olarak tüketilen gıdalardan *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *B. cereus* gibi patojenler izole edilmiş ve taze olarak tüketilen ürünler nedeniyle tüm dünyada meydana gelen salgınlarda endişe verici bir hal aldığı belirtilmiştir (Seow ve ark.,2012). Taze kesilmiş marul tüketimiyle ilişkili olarak *E. coli* O157:H7 riski değerlendirildiğinde hem sulama suyunun mikrobiyal kalitesinin hem de sulama şeklinin hasatta *E. coli* O157:H7 bakterisi sayısını üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu yapılan bir çalışmayla belirtilmiş olup damla sulama sisteminin kullanımı, uygun gübreleme şekli ve yağışın doğru şekilde değerlendirilmesi ile *E. coli* O157:H7 seviyelerinin sırasıyla 7.4, 6.5 ve 4.3 log azaldığı da kaydedilmiştir. (Bozkurt ve ark., 2021). Belçika'da marul, toprak ve su örneklerinin incelendiği bir çalışmada açık tarlalardan alınan örneklerde, seralardan alınan örneklere göre *E. coli* O157 gibi EHEC dahil patojenik bakterilerin daha fazla oranda bulunduğu bildirilmiştir (Holvoet ve ark., 2015). *E. coli* O157:H7 aynı zamanda marul tohumlarına da yapışabilmekte ve uzun süre canlılığını koruyabilmektedir. Marul tohumlarına enfekte edilen *E. coli* O157:H7 bakterisinin tohumların %8.7'sinde 2 yıl boyunca canlı kalabildiği ve patojenin tohumlara enfekte edilmesinden 2 yıl sonra fidelerin %12.5'inde rastlandığı olgun marullarda ise test edilmediği belirtilmiştir (Van der Linden ve ark., 2013; Cui ve ark., 2017). Bakteri yükü bitki çeşidine göre değişebildiği gibi aynı bitkinin yaprakları arasında bile farklılık gösterebilmektedir öyle ki meyve ve sebzelerin iç kısımları genelde steril olarak kabul edilir ancak yapılan bir çalışma *E. coli* O157:H7'nin hayvan gübresi uygulanmış topraktan marula geçebileceğini ortaya koymuş ve aynı çalışmada *E. coli* O157:H7'nin kök sisteminden marula geçebildiği ve yenebilir kısımlara doğru göç edebildiği de bildirilmiştir (Solomon ve ark., 2002). Mukherjee ve ark (2004) nın yaptığı benzer bir çalışmada marulun, taze meyve ve sebzeler arasında bakteriyel kontaminasyon açısından en elverişli sebze olduğu belirtilmiş ve yine Mukherjee ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir diğer araştırmada organik örneklerin %9.7'sinde, konvansiyonel örneklerin de %1.6'sında *E. coli* varlığı tespit edilmiş olup organik marullarda örneklerin yaklaşık % 22.4'ü *E. coli* pozitif bulunurken bu oran çalışmada kullanılan diğer örneklerden (yeşil yapraklı sebzeler, kabak, domates, yeşilbiber, salatalık ve brokoli) oldukça yüksek olarak kayıtlara geçmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada kullanılan taze marul örnekleri bir yıl boyunca düzenli olarak Aydın ilinde bulunan semt pazarlarından 50 adet, marketlerden de 50 adet olmak üzere toplam 100 adet örnek olacak şekilde satın alınarak toplanmıştır. Pazar ve marketlerden satın alınan toplam 100 adet taze marul örneklerinin aylara göre dağılımı ve satın alınan miktarları Çizelge 1' de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Market ve pazarlardan alınan örnekler (Table 1. Samples taken from markets and markets).

Örnek Sayısı		
Aylar	Marketlerden	Pazarlardan
Ocak	15	15
Şubat	15	15
Mart	10	10
Nisan	10	10
Mayıs	-	-
Haziran	-	-
Temmuz	-	-
Ağustos	-	-
Eylül	-	-
Ekim	-	-
Kasım	-	-
Aralık	-	-
TOPLAM	50	50

Ocak ve şubat aylarında market ve pazarlardan 15' er adet, mart ve nisan aylarında da 10' ar adet olmak üzere toplamda 100 adet olarak temin edilen örneklerin en dış kısmındaki yaprakları uzaklaştırıldıktan sonra göbek kısmı steril şekilde çıkarılarak steril poşetlere yerleştirilmiş ve sonrasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na soğuk zincirde getirilmiştir.

2.1.1. Örneklerin İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri

İzolasyon besiyeri

Çalışmamız için svap örneklerinin taşınmasında ve bakterinin zenginleştirilmesinde modifiye tryptic soy broth (mTSB) kullanılmıştır. Gram negatif mikroorganizmaların gelişimini engellemek için zenginleştirme besiyeri olarak kullanılan mTSB'de novobiocin veya acriflavin bulunmaktadır (Vernozy-Rozand, 1997). mTSB besiyeri 33 g L⁻¹ konsantrasyonda 1 L distile suda eritilerek hazırlanmış, erlenlere 225 ml olacak şekilde dağıtılmış ve daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Alınan marul örneklerinde *E. coli* O157:H7 bakterisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla 25 g örnek 225 ml mTSB (O157 Broth) ile homojenize edilerek 37±0.5°C'de 24 saatlik inkübasyon ile ön zenginleştirme yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında öze yardımıyla SMAC Agar (Sorbitol MacConkey Agar,) besiyerine aktararak 35-37°C'de 18-24 saat süreyle inkübe edilmiştir. CT-SMAC agarda çoğalıp sorbitol negatif sonuç veren kolonilerden öze yardımı ile Fluorocult *E. coli* O157:H7 agara ekimleri yapılmıştır. Şüpheli olduğu gözlenen koloniler ise, indol içeren besiyerinde 35-37°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrasında üzerine 1 ml kovaks ayracı dökülüp karıştırılarak doğrulama yöntemine gidilmiştir.

İdentifikasyon Besiyerleri

Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar ve CT SMAC Agarda üreme

E. coli O157:H7 serotipi sorbitolü fermente etmediğinden ve diğer *E. coli* serotipleri sorbitolü fermente ettiklerinden dolayı *E. coli* O157:H7 izolasyonunda genellikle sorbitol MacConkey agar (SMAC) kullanılmaktadır (Vernozy-Rozand 1997).

Çalışmamızda da SMAC agara daha selektif olması için sefiksim (0.05 mg L⁻¹) ve potasyum tellürit (2.5 mg L⁻¹) (CT) katkısı ilave edilmiş ve bu şekilde diğer floranın yanlış negatif sonuçlar vermesinin önüne geçilmiştir. Sorbitol MacConkey agardan (Difco 279100) 51.6 g L⁻¹ oranla 25.8 g agar 500 ml distile su içerisinde ısıtılarak eritilmiştir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. CT-SMAC Agar katkısı agara eklenmeden önce bir şişe katkı üzerine 1 ml distile su ilave edilip karıştırılmış, otoklav sonrasında 45 °C'ye kadar soğutulan 500 ml agara aseptik şartlarda CT katkısı ilave edilerek karıştırılmış ve petri kaplarına 12.5 ml/petri olarak dağıtılmıştır (Weagant ve ark., 1995). mTSB besiyerinde çoğalan gram-negatif ve indol pozitif *E. coli* şüpheli kolonileri CT-SMAC agara öze ile ekim yapıldıktan sonra petri kapları 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrasında renksiz kolonilerin sorbitol negatif, pembe-kırmızı kolonilerin ise sorbitol pozitif olarak değerlendirilmeleri yapılmıştır (Doyle ve ark., 1987).

Fluorocult *E. coli* O157:H7 Agarda Üreme

Fluorocult *E. coli* O157:H7 agarın kullanım amacı, CT-SMAC negatif olan kolonilerin β-glukuronidaz aktivitesini belirlemek olup hazırlanan besiyeri 55 g L⁻¹ olacak şekilde ısıtılarak distile su içinde eritilmiş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra petri kaplarına boşaltılmıştır (Szabo ve ark., 1986). CT-SMAC agarda gelişip sorbitol negatif sonuç veren koloniler öze yardımıyla Fluorocult *E. coli* O157:H7 agara ekim yapıldıktan sonra petri kapları 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmış olup, inkübasyon süresi sonunda sorbitolü kullanamayan bakteriler renksiz, sorbitol pozitif bakteriler ise sarı renkli koloniler oluşturmuştur. Sorbitol negatif veren koloniler de UV ışığı (366 nm) altında incelenmiş ve ışımaya vermeyen koloniler *E. coli* O157:H7 şüpheli olarak nitelendirilmiştir.

İndol test ortamı olarak, Pepton 4 g, Sodyum klorid 2 g, Distile su 100 ml şeklinde hazırlanan karışımın pH'sı 7.4–7.6'ya ayarlandıktan sonra, tüplere 3-5 ml olacak şekilde dağıtılmış ve otoklavda 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir (Koneman ve ark., 1997). Ayracı olarak indol ayracı, P-Dimethylaminobenzaldehyde 10g, Isoamyl alcohol 150ml, HCl (konsantre) 50 ml kullanılmış, ayrıca gram boyamalar da yapılmıştır.

Araştırmamızda *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 suşu referans suş olarak, negatif kontrol olarak ise *S. aureus* ATCC 25923 suşu kullanılmıştır.

Antiserum Test Kitleri

E. coli O157 lam aglutinasyon testi

E. coli O157 lam aglutinasyon testi, O157 somatik antijenine karşı hazırlanmış spesifik somatik (O) antikorları (polivalan antiserum: domuz; monovalan antiserum: tavşan) içeren ve koruyucu olarak 0.08 w/%v sodyum azid ilave edilmiş sıvı ürün kullanılan, lam üzerinde antijen ve antikor aglutinasyonuna dayanan test olup, test içeriğinde alternatif grup O antiserumu da bulunmaktadır. *E. coli* O157:H7 şüpheli olan kolonilerde O157 antijeninin varlığının belirlenmesi için O157 lam aglutinasyon testi uygulanmış (Sakazaki, 1992) ve şüpheli olduğu gözlenen kolonilerden üç öze dolusu alınarak 3 ml fizyolojik tuzlu su içine süspanse edilmiştir. Süspanسیون 121°C'de 15 dk, 100°C'de 1 saat bekletildikten sonra 900 devirde 20 dk santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılmış

çökelti 0.5 ml fizyolojik tuzlu su ile süspansiyon edilerek antijenik solüsyon olarak kullanılmıştır. Daha sonra her polivalan antiserumdan bir damla ve 30 µl fizyolojik tuzlu su, asetat kalemi ile bölmelere ayrılmış temiz lamlar üzerine damlatılmıştır. Lam üzerindeki her antiserum-fizyolojik tuzlu su karışımının üzerine antijenik süspansiyondan 5-10 µl damlatılmış ve lamlar sağa sola 1 dk boyunca hareket ettirilmiş süspansiyonların karışması sağlandıktan sonra O157 pozitif olan karışımlarda aglutinasyon deseni şekil almıştır. Aglutinasyon ilk 1 dk sonrasında oluştuğu için aglutinasyon oluşmayan veya hafif oluşan örnekler negatif olarak kabul edilirken, tam aglutinasyon şekillenenler pozitif olarak kaydedilmiştir. Polivalan serum ile pozitif sonuç veren örnekler polivalan serumun içerdiği monovalan serumlar belirlenerek, yukarıdaki işlemler monovalan serum kullanılarak da tekrarlanmış olup aglutinasyon pozitif O antiserumları tespit edilmiştir.

***E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon Testi**

Bu test, O157 somatik antijenine karşı spesifik antikorların *E. coli* O157 şüpheli kolonilerle temas ettiğinde aglutinasyon şekillenmesine dayalı hızlı bir test olup test kitinin içeriğinde test lateksi, kontrol lateksi, pozitif ve negatif kontrol süspansiyonları ve reaksiyon kartları bulunmaktadır. *E. coli* O157 lam aglutinasyon testi ile O157 antijenine sahip olduğu tespit edilen kolonileri desteklemek için *E. coli* O157 lateks aglutinasyon testi yapılmıştır (March ve ark., 1989). Buzdolabında 2-8°C arasında bekletilen lateks belirteçleri oda sıcaklığına getirilmiş, lateks süspansiyonları iyice çalkalanmış, bu sırada süspansiyonların dökülmemesine çok dikkat edilmiştir. Reaksiyon kartının üzerindeki dairelerden birine dairenin iç kenarına gelecek biçimde 1 damla test lateksi damlatılmış, dairenin bir başka kenarına da lateks süspansiyonu ile karışmayacak biçimde 1 öze dolusu fizyolojik tuzlu su damlatılmıştır. Sonrasında test edilecek koloniden 1 öze dolusu alınıp fizyolojik tuzlu su damlası ile dikkatlice iyice karıştırılmıştır. Örnek-fizyolojik tuzlu su süspansiyonu test lateksi damlasıyla karıştırılıp dairenin içine öze ile yayıldıktan sonra öze alevden geçirilip sterilize edilmiştir. Reaksiyon kartı 1 dk kadar dairesel hareketlerle sallanmış aglutinasyonun şekillenmesi için beklenmiştir ve kartın 1 dakika süreden fazla sallanmamasına özen gösterilmiştir. Aglutinasyon şekli veren örneklerin O157 serotipine ait olduğu bu sayede doğrulanmıştır. Bir dakika içinde aglutinasyon şekillenmeyen izolatlar O157 negatif olarak değerlendirilmeliydi fakat yaptığımız O157 lam aglutinasyon testini doğrular biçimde lateks testte kullanılan izolatların tamamı pozitif sonuç göstermiştir.

H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi

H7 tüp aglutinasyon testinde, H7 flagellar antijenine karşı hazırlanmış spesifik flagella (H) antikorları (tavşan) bulunan ve koruyucu olarak 0.08 w/v sodyum azid eklenmiş sıvı ürün içeren, tüp içinde antijen ve antikor aglutinasyonu esasına dayanan bir test olup test kiti içeriğinde bulunmayan ancak kullanımı gerekli yarı sıvı medyum, sıvı medyum ve %1 formalin içeren fizyolojik tuzlu su ve su banyosu (50°C) gibi bazı materyaller mevcuttur. *E. coli* O157 olarak belirlenen kolonilerde *E. coli* O157:H7 varlığının incelenmesi amacıyla H7 antiserumuyla tüp aglutinasyon testi uygulanmış (Sakazaki, 1992), koloniler Brain Heart infüzyon sıvı besiyerine inokulasyona hazırlanmaları için Craigy's tüpü içinde bulunan yarı sıvı medyumdan 3-5 defa geçirilmiştir. Ardından BHI sıvı

medyumuyla hücre kültürü hazırlanmış ve 37 °C'de bir gece süreyle inkübe edilmiş eşit miktarda %1 w/v formalin içeren fizyolojik tuzlu su ile karıştırılmıştır. Test tüplerine üçer damla H antiserumlarından ilave edildikten sonra her bir tüpe 0.5 ml hücre süspansiyonundan damlatılmış ve H antiserumu bulunmayan bir tüp de kontrol kabul edilmiştir. Tüplerde bulunan antiserum ile hücre süspansiyonları tamamen karıştırıldıktan sonra 50°C'lik su banyosunda 1 saat süreyle bekletilmiş daha sonra tüpler aglutinasyon oluşup oluşmadığını anlamak için çıplak gözle incelenmiştir. Aglutinant kolay dağılabileceği için inceleme yapılırken tüplerin sarsılmamasına özen gösterilmiştir ve sonrasında H7 antiserumuyla aglutinasyon deseni şekillenmiş olan tüplerdeki koloniler *E. coli* O157:H7 pozitif kaydedilmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Bu çalışmada kullanılan marul örneklerinde yapılan izolasyon ve identifikasyon prosedürleri sonucunda örnek alınan marulların tümünden toplam 17 (%17) adet *E. coli* O157:H7 izole ve tanımlanmış olup *E. coli* O157:H7 patojenlerinin 12 (%12) adedi semt pazarlarından alınan marul numunelerinden, 5 (%5) adedi ise marketlerden alınmış olan numunelerden elde edilmiştir. *E. coli* O157:H7 sayıları dağılım olarak Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Örneklem yerleri ve örneklerdeki E. coli O157:H7 identifikasyon sayıları (Table 2. Çizelge 2. Örneklem yerleri ve örneklerdeki E. coli O157:H7 identifikasyon sayıları (Table 2. Sampling sites and E. coli O157:H7 identification numbers in samples).

Örneklem yapılan yerler	Marul örnekleri sayısı (adet)	<i>E. coli</i> O157:H7 identifikasyon sayıları	<i>E. coli</i> O157:H7 izolatlarının yüzde oranları (%)
Semt pazarları	100	12	12
Marketler		5	5
TOPLAM	100	17	17

Elde ettiğimiz bulgular ışığında semt pazarlarından yapılan identifikasyon oranının market identifikasyonlarından daha yüksek olduğu gözlenmiş ve ülkemizde Kara ve ark., (2019) tarafından yapılan benzer bir çalışmada da Afyonkarahisar ilindeki pazar ve marketlerden temin edilen toplam 70 adet taze marul örneğinde *E. coli* O157 varlığı 2 (%2.86) örnekte tespit edilmiş olup çalışmamızda ise bu oran toplam 100 adet örnekte 17 (%17) adet olacak şekilde daha yüksek oranda elde edilmiştir. Al-Kharousi ve ark., (2016) tarafından Oman'da yürütülen bir çalışmada da toplam 105 adet ithal taze sebze ve meyve örneği incelenmiş sebzelerin %22'sinde, meyvelerin %7'sinde *E. coli* varlığı kaydedilirken çalışmamızda ise sonuçlar sebze grubu açısından değerlendirildiğinde marul örneklerinde bu oran %17 olarak daha düşük seviyede bulunmuştur.

Çalışmada *E. coli* O157:H7 bakterisinin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde, ocak ayında alınan örneklerde Sefiksım-tellürit tatkılı sorbitol MacConkey agarda üreme 9 adet, Fluorocult *E. coli* O157:H7 Agarda üreme 9 adet, *E. coli* O157 Lam Aglutinasyon Testi (pozitif) 3 adet, *E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon Testi (pozitif) 3 adet ve H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi (pozitif) 3 adet olarak kaydedilmiştir. Şubat ayında ise örneklerde Sefiksım-tellürit tatkılı sorbitol MacConkey

agarda üreme ve Fluorocult *E. coli* O157:H7 Agarda üreme 10'ar adet, *E. coli* O157 Lam Aglutinasyon Testi (pozitif), *E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon Testi (pozitif) ve H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi (pozitif) de 3'er adet olacak şekilde kayıtlara geçmiş olup en fazla üreme ise Mart ayında yapılan testlerde gerçekleşmiştir. Buna göre Sefiksim-tellürit katkı sorbitol MacConkey agarda üreme ve Fluorocult *E. coli* O157:H7 Agarda üreme 12'şer adet, *E. coli* O157 Lam Aglutinasyon Testi (pozitif), *E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon Testi (pozitif) ve H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi (pozitif) ise 8'er adet olacak şekilde kaydedilmiştir. Nisan ayındaki test sonuçları da Sefiksim-tellürit katkı sorbitol MacConkey agarda üreme ve Fluorocult *E. coli* O157:H7 Agarda üreme 8'er adet, *E. coli* O157 Lam Aglutinasyon Testi (pozitif), *E. coli* O157 Lateks Aglutinasyon Testi (pozitif) ve H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi (pozitif) ise 3'er adet olacak biçimde kaydedilmiştir.

Worley ve ark.,(2017) tarafından yapılan bir çalışmada marulda *E. coli* O157 yaygınlığının mevsimsel olarak farklılık gösterdiği ve Kaliforniya'da 20 farklı çiftlikten toplanan inek dışkı örneklerinde *E. coli* O157:H7 prevalansının ilkbahar (%6.8) ve sonbahar (%5.8) mevsimlerinde, yaz (%0.5) ve kış (%3.4) mevsimlerine oranla daha yüksek olduğu bildirilirken çalışmamızda laboratuvar koşullarında yapılan testlerde ise mevsimsel olarak karşılaştırma yapıldığında en fazla üremenin Mart ayında olduğu en az üremenin ise Nisan ayında gerçekleştiği gözlenmiştir. Ayrıca Kaliforniya'daki havza alanlarından toplanan su örneklerinde de *E. coli* O157:H7 varlığı ilkbaharda (%9.50) ve sonbaharda (%11.75) yaz (%4.02) mevsimine göre daha yoğun olarak bulunmuştur (Tian ve ark., 2017). Yeşil yapraklı ve doğrudan tüketilen bitkilerde *E.coli* O157:H7 gibi enterohemorajik *E.coli* (EHEC) suşlarının varlığının araştırıldığı bir başka çalışmada, EHEC prevalansının 2007-2013 yılları arasında özellikle Kaliforniya'nın orta kıyı bölgesindeki bitkilerde önemli ölçüde artış gösterdiği

(<0.01-%2.5) ve EHEC prevalansının, çevresinde çiftliklerin bulunduğu alanlardan elde edilen yeşil yapraklı bitkilerde daha yaygın olduğu belirtilmiş olup (Karp ve ark., 2015) *E. coli* O157:H7'nin yol açtığı bir dizi salgının marul tüketimi ile ilişkilendirilmesi ile beraber yapmış olduğumuz çalışmamızda da semt pazarlarından alınan örneklerden daha fazla seviyede *E. coli* O157:H7 elde edilmesi, üretim sırasında hayvansal gübre kullanılması sonucu daha fazla maruz kaldığı hipotezini desteklemektedir. Organik ürünlerde geleneksel ürünlere göre önemli ölçüde daha yüksek *E. coli* prevalansının bulunduğu ayrıca bir yıldan daha kısa bir süre depolanmış gübrelerin kullanımında daha yüksek *E. coli* prevalansı olduğu yapılan bir çalışmada belirtilmiş olup çiftliklerde kullanan gübrenin sonbaharda mı yoksa ilkbaharda mı uygulanmış olmasının üründe *E. coli* oluşumunda etkin bir rol oynamadığı da bildirilmiştir (Mukherjee ve ark., 2004). Cayalvizhi ve Balachandhar (2018) tarafından taze tüketilen sebzelerde shiga benzeri toksin salgılayan *E. coli* O157'nin prevalansı ve karakterizasyonu hakkında Hindistan'da bir çalışma yapılmış, market ve pazarlardan temin edilen salatalık, turp, marul, lahana ve mentol içerikli (menthos) bitkilerde *E. coli* O157'nin varlığı araştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda gözlenmiştir ki incelenen beş sebze örneği arasında en yüksek Stx pozitif koloniye sahip olarak lahana (%16) örneği bulunmuş ve bu oran çalışmamızda kullandığımız marul örneklerindeki orana (%17) yakın olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sebzelerdeki *E. coli* O157 yükü, süpermarketlerden alınan örnekler ve pazarlardan alınan örnekler açısından karşılaştırıldığında pazar örneklerinde kayda değer bir oran bulunamazken bizim çalışmamızda ise semt pazarlarından alınan örneklerden daha fazla seviyede *E. coli* O157:H7 elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada taze tüketilen sebzelerde *E. coli* O157 popülasyonunun %6' sının %2' lik eşik seviyesinin çok üzerinde olduğu belirtilmiş ve hastalık salgını ile ilgili olarak bir uyarı öngörüsü bildirilmiştir.

Çizelge 3. Yapılan testlerin aylara göre dağılımı (Table 3. Distribution of tests performed by months).

Aylar	Testler				
	Sefiksim-Tellürit Katkılı Sorbitol MacConkey Agarda Üreme	Fluorocult <i>E.coli</i> O157:H7 Agarda Üreme	<i>E. coli</i> O157 Lam Aglutinasyon Testi (pozitif +)	<i>E. coli</i> O157 Lateks Aglutinasyon Testi (pozitif +)	H7 Antiserum Tüp Aglutinasyon Testi (pozitif +)
Ocak	9	9	3	3	3
Şubat	10	10	3	3	3
Mart	12	12	8	8	8
Nisan	8	8	3	3	3
Mayıs	-	-	-	-	-
Haziran	-	-	-	-	-
Temmuz	-	-	-	-	-
Ağustos	-	-	-	-	-
Eylül	-	-	-	-	-
Ekim	-	-	-	-	-
Kasım	-	-	-	-	-
Aralık	-	-	-	-	-

4. Sonuç

Çalışmamızda Aydın ilinde bulunan semt pazarları ve marketlerden alınan marul örneklerinde ilk kez *E. coli* O157:H7 varlığı araştırılmış, etmenin izolasyon ve identifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *E. coli* O157:H7 prevalansının semt pazarlarından alınan marul örneklerinde daha yüksek olması, ürünlerin fekal kontaminasyona müsait olduğu fikrini destekler niteliktedir. Çalışmamıza konu olan marul bitkilerine bulaşabilecek *E. coli* O157:H7 patojenlerinin bulaşma riskini azaltmak adına gübre ile bulaşma seviyelerini düşürmek için hayvancılık uygulamalarında iyileştirmeler yapılması tavsiye edilebilir. Sulama suyunun fekal materyalle bulaşmasını önlemek adına da dış alan hayvancılığı konusuna özen gösterilmeli ve hayvan gübresi ile bulaşma riski söz konusu olan suların sulama suyu olarak kullanılmamasına dikkat edilmelidir. Sulama suyu olarak kullanılan suların mikrobiyolojik kalitesi düzenli olarak kontrol edilirse sudan kaynaklanabilecek bulaşmaların da bu sayede önüne geçilebilir. Ayrıca hasat öncesi ve hasat sırasında kullanılan alet-ekipmanlarında temizliğine ve bulaşık olmamasına da özen gösterilmelidir. Elde edilen sonuçlara göre insan beslenmesinde çiğ olarak tüketilen gıda ürünlerinin önemli bir yere sahip olması nedeniyle gıda güvenliği konusunda bu tip gıdaların mikrobiyolojik kalitesini arttırmada gerekli önlemler alınması gerektiği konusu ortaya konulmuştur.

5. Teşekkür

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri VTF-14011 kodlu proje tarafından desteklenmiştir.

Kaynakça

- Al-Kharousi, Z.S, Guizani, N., Al-Sadi, A.M., Al-Bulushi, I.M., Shaharoon, B. (2016). Hiding in fresh fruits and vegetables: Opportunistic pathogens may cross geographical barriers. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology*, Article ID 4292417, 14.
- Berry, E.D, Wells, J.E., Durso, L.M., Friesen, K.M, Bono, J.L, Suslow, T.V. (2019). Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in pest flies captured in leafy greens plots grown near a beef cattle feedlot. *J. Food Prot*, 82, 1300–1307.
- Bozkurt, H., Bell, T., Ogtrop, F., Kim-YenPhan-ThieN, McConchie, R. (2021). Assessment of microbial risk during Australian industrial practices for *Escherichia coli* O157:H7 in fresh cut-cos lettuce: A stochastic quantitative approach. *Food Microbiology*, 95, 103691.
- Cayalvizhi, B.S., Balachandhar, D. (2018). Prevalence of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* strain (*E. coli* O157) in freshly consumed vegetables and its characterization. *Journal of Food Safety*, 39(1).
- Chapman, P.A., Siddons, A., Wright, D.J, Norman, P., Fox, J., Crick, E, (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections in man. *Epidemiology of Infection*, 111, 439-447.
- Chaudry, M.A., Bibi, N., Khan, M., Badshah, A., Qureshi, M.J., (2004). Irradiation treatment of minimally processed carrots for ensuring microbiological safety. *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 169–173.
- Cui, Y., Walcott, R., Chen, J. (2017). Differential attachment of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli*

- to alfalfa, fenugreek, lettuce, and tomato seeds. *Appl. Environ. Microbiol*, 83(7), 1-7.
- De Jesus, A.J, Olsen, A.R, Bryce, J.R., Whiting, R.C. (2004). Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Int. J. Food Microbiol*, 93, 259–262.
- Doyle, M.P., Schoeni, J.L. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied Environmental Microbiology*, 53 (10), 2394-2396.
- Gündüz, T.G. (2008). Engelleme Teknolojisinin Sebzelere Patojen İnaktivasyonu ve Raf Ömrü Açısından Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir.
- Holvoet, K., Sampers, I., Seynaeve, M., Jacxsen, L., Uyttendaele, M. (2015). Agricultural and management practices and bacterial contamination in greenhouse versus open field lettuce production. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(1), 32-63.
- Johannessen, G.S., Loncarevic, S., Kruse, H. (2002). Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 199-204.
- Kara, R., Acaröz, U., Gürler, Z., Soylu, A., Küçükkurt, O. (2019). Taze marul örneklerinde *Escherichia coli* O157 ve *Listeria monocytogenes* varlığının belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 16, 871-873.
- Karp, D.S., Gennet, S., Kilonzo, C., Partyka, M., Chaumont, N., Atwill, E.R, Kremen, C. (2015). Comanaging fresh produce for nature conservation and food safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 11126-1131.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M, Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. (1997). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology (fifth edition), Eds Andrew Allen, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1307-1371.
- March, S.B., Ratnam, S.J. (1989). Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7), 1675–1677.
- Meng, J., LeJeune, J.T, Zhao, T, Doyle, M.P. (2012). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Chapter 12.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., Diez-Gonzales, F. (2004). Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* And *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection*, 67, 894–900.
- Mukherjee, A, Cho, S., Scheffel, J., Jawahir, S., Smith and Diez-Gonzalez F. (2006). Soil survival of *Escherichia coli* O157 H7 acquired by a child from garden soil recently with cattle manure. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 429-436.
- Öğüt, S., Polat, M. (2009). Bazı Beş Yıldızlı Otellerde Hazırlanan Gıdaların Mikrobiyolojik Açısından Değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Yaşam Dergisi*, 12-16.
- Sakazaki, R. (1992). Serotyping of diarrheagenic *E. coli*. *Media Circle*, 34, 117.
- Seow, J., Agoston, R., Phus, L., Yuk, H. (2012). Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control*, 25, 39-44.
- Solomon, E., Yaron, S., Matthews, K. (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 397–400.
- Szabo, R.A., Todd, E.C.D., Jean, A. (1986). A method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. *Journal of Food Protection*, 49: 768-772.

- Tian, P., Yang, D., Shan, L., Wang, D., Li, Q., Gorski, L., Lee, B.G., Quinones, B., Cooley, M.B. (2017). Concurrent detection of human norovirus and bacterial pathogens in water samples from an agricultural region in central California coast. *Front. Microbiol*, 8 (1560).
- Ustaelebi, Ő. (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara. ncü Basımevi, 470-485.
- Van der Linden, I., Cottyn, B., Uyttendaele, M., Vlaemynck, G., Maes, M., Heyndrickx, M. (2013). Long-term survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on butterhead lettuce seeds, and their subsequent survival and growth on the seedlings. *Int. J. Food Microbiol*, 161, 214–219.
- Vernozy-Rozand, C. (1997). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other Verocytotoxinproducing *E. coli* (VTEC) in food. *Journal of Applied Microbiology*, 82,537-551.
- Weagant, S.D, Bryant, J.L, Jinneman, K.G. (1995). An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods, *Journal of Food Protection*, 58 (1), 7-12.
- Worley, J.N., Flores, K.A, Yang, X., Chase, J.A, Cao, G., Tang, S., Meng, J., Atwill, E.R. (2017). Prevalence and genomic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in cow-calf herds throughout California. *Appl. Environ. Microbiol*, 83(16).
- Yücel, P.K., Halkman, H.B.D. (2009). Minimal İşlem Görmüş Meyve ve Sebzelerin İşınlama ile Kalitesinin Arttırılması. X. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi, 6-9 Ekim, Muğla, 291-301.