



Tıbbi Bitki Çaylarında Mikrobiyolojik Kalitenin ve Bazı Patojenlerin Araştırılması

Aydın VURAL^{1,a,✉}, Hüsnu Şahan GÜRAN^{1,b}, Halil DURMUŞOĞLU^{1,c}, Uğur UÇAR^{1,d}

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin-Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Diyarbakır

^aORCID: 0000-0002-6232-2131; ^bORCID: 0000-0002-6674-5510; ^cORCID: 0000-0002-0469-245X; ^dORCID:0000-0002-7394-3355

Geliş Tarihi/Received
24.04.2020

Kabul Tarihi/Accepted
22.06.2020

Yayın Tarihi/Published
30.06.2020

Öz

Tıbbi bitki çayları sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı her yaş grubu tarafından tüketilmektedir. Bu çalışmada ambalajlı ve ambalajsız olarak perakende satışa sunulan farklı tıbbi bitki çaylarının (kekik, nane, rezene, adaçayı, ihlamur, hatmi, sinameki, defne, civanperçemi ve anason) mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi amaçlandı. Analiz edilen 120 örneğin %95, %90, %77.5, %74.16, %42.5, %14.17, %3.33 ve %2.5'inin sırasıyla toplam mezofilik aerobik bakteriler (TMAB), küf-maya, *Enterobacteriaceae*, koliform, sülfid indirgeyen anaerob bakteriler, *Staphylococcus-Micrococcus* spp., *Escherichia coli* ve *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu belirlendi. Ancak örneklerin hiçbirinde *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* tespit edilmedi. En yüksek ortalama TMAB (5.03 log₁₀ kob/g) sayısı nane örneklerinde; *Enterobacteriaceae* (4.19 log₁₀ kob/g), koliform (3.87 log₁₀ kob/g) ve küf-maya sayısı (4.92 log₁₀ kob/g) ise hatmi örneklerinde bulundu. Kapalı ambalajlarda satışa sunulan örneklerdeki ortalama *Enterobacteriaceae* ve koliform bakteri sayıları açıkta satışa sunulan örneklerden önemli derecede daha düşük bulundu (P<0.05).

Bu çalışma sonuçları tıbbi bitki çaylarının mikrobiyolojik kalitesinin yetersiz olduğunu; *E. coli* ve *Salmonella* spp. gibi patojenlerle kontamine olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Tıbbi bitki çayları, mikrobiyolojik kalite, patojen

Investigation of Microbiological Quality and Some Pathogens in Medicinal Herbal Teas

Abstract

Medicinal herbal teas are consumed by all age groups for beneficial effects on health. In this study, it was aimed to determine the microbiological quality in packaged and unpackaged different medicinal herbal teas (thyme, mint, fennel, sage, linden, alcea, senna, laurel, yarrow and anise) sold at retail. Out of the 120 analysed samples, 95%, 90%, 77.5%, 74.16%, 42.5%, 14.17%, 3.33% and 2.5% were contaminated with total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), mold-yeast, *Enterobacteriaceae*, coliform, sulphide reducing anaerobe bacteria, *Staphylococcus-Micrococcus* spp., *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., respectively. However, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were not detected in any of the samples. The highest mean count was determined in mint samples for TMAB (5.03 log₁₀ cfu/g); in alcea samples for *Enterobacteriaceae* (4.19 log₁₀ cfu/g), coliform (3.87 log₁₀ cfu/g) and yeast-mold (4.92 log₁₀ cfu/g). The mean counts of *Enterobacteriaceae* and coliform in packaged samples were significantly less than unpackaged samples (P<0.05).

The results obtained in this study showed that the microbiological quality of the investigated medicinal herbal teas were inadequate and can be contaminated with pathogens such as *E. coli* and *Salmonella* spp. bacteria.

Key Words: Medicinal herbal teas, microbiological quality, pathogen

GİRİŞ

Bitkilerin sıcak su infüzyonları Uzak Doğu ve Akdeniz ülkelerinde binlerce yıldır lezzetleri ve aromaları için içecek olarak kullanılmaktadır. Birçoğunun tıbbi özelliklere sahip olduğuna inanılmakta olup, bazı hastalıkları ve rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (1). Bitki çayları temin edilmelelerinin ve hazırlanmalarının nispeten kolay olması, ucuz ve yararlı bileşenler yönünden zengin olmaları ve önemli yan etki göstermemeleri gibi nedenlerle herhangi bir hekim tavsiyesi beklenmeden yaşlılar veya bağışıklığı zayıf bireyler tarafından tercih edilebilmektedir. İshal, kabızlık, soğuk algınlığı, yorgunluk ve uykusuzluk gibi çeşitli rahatsızlıklara karşı tüketilen bitki çayları elde edildikleri bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek ve tohum gibi kısımlarından elde edilir (2).

Küresel olarak tıbbi ve aromatik bitkilerin artan farkındalığı sayesinde tıbbi (şifalı) bitkiler pazarı yıllık %7-10 oranında büyümektedir. Dünya çapında pazarlarının büyümesi, tanınmaları ve kısmen "doğal" olanın "zararsız" olarak var sayımı nedeniyle bitkisel ürünlerin güvenliği halk sağlığında en önemli kaygılardan biri haline gelmiştir (3). Baharatlar ve bitkiler, tüketici için olası sağlık problemlerine, gıdalar içinse kalite ve raf ömrü sorunlarına neden olan mikroorganizmalar için önemli vektörler olarak kabul edilmektedir (4). Bitkilerin doğal florasında bulunan mikroorganizmalar ile hasat, kurutma, işleme, taşıma, paketleme ve satış gibi işlemler mikroorganizma yükü üzerinde belirleyici rol oynar. Kanalizasyon, toz, insekt, kuş ve kemirgenlerin atıkları ile kullanılan sular bu ürünlerin diğer kirlilik kaynaklarıdır. Kuru bitkilerin mikrobiyolojik kalitesi yetiştirildiği bölgeye, taşıma koşulla-

rına ve bu ürünlerin depolanmasına bağlıdır (5, 6, 7). Bitki çaylarının mikroorganizma içeriği kalite ve güvenliğin göstergesi olarak değerlendirilmelidir. Çayların işlenmesi sırasında iyi üretim ve hijyenik üretim uygulamalarına bağlı kalınmadığında işleme sonrası çevre, hava ve personel kaynaklı kontaminasyonlar mikroorganizma yükünün artmasına neden olabilir (8). Teknolojik düzeydeki (üretim ve paketlenme), aktif bileşenlerdeki veya dağıtım süreçlerindeki farklılıkların bitkilerdeki kontaminasyon düzeylerini etkileyebileceği bildirilmiştir (7). Meksika'da bazı baharat ve bitkilerdeki mikrobiyolojik kalitenin incelendiği çalışmada ambalajsız defne yapraklarının %10'unun, polietilen ambalajdaki örneklerin ise %2'sinin 10^5 kob/g'dan fazla toplam mezofilik aerobik bakteri içerdiği, cam ambalajdaki defne yapraklarının tamamının (%100) ise 10^3 kob/g'dan az bakteri sayısına sahip olduğu bildirilmiştir (9).

Bitki çayları çoğunlukla sıcak su içerisinde demlenerek tüketilmektedir. Yüksek derecelerdeki sıcak su kullanılmasına rağmen mikroorganizma varlığını gösteren çalışmalar mevcuttur. 67°C ve 90°C 'de demlenen rezene çaylarında ortalama toplam bakteri sayısı 1.3×10^4 ve 1.4×10^4 kob/100 ml çay; aerob sporlu bakteri sayısı 1.2×10^3 ve 1.2×10^4 kob/100 ml çay olarak bildirilmiştir. Nane çaylarında ise toplam bakteri sayısı (90°C 'de) 4.7×10^5 kob/100 ml çay ve aerob sporlu bakteri sayısı (67°C 'de) 3.7×10^5 kob/100 ml çay olarak tespit edilmiştir. 67°C 'de demlenmiş rezene ve nane çaylarında sırası ile 4.0×10^2 ve 2.0×10^2 kob/100 ml çay düzeyinde küf bulunurken, 90°C 'de demlenmiş çaylarda küf saptanmamıştır (10).

Bitki çaylarının mevzuatta yer alış şekli (bitki, bitki çayı, bitki karışımı, baharat vb), incelenmesi istenilen mikroorganizmalar ve limitler tüm dünyada farklılıklar göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ham bitki materyali için maksimum küf-maya sayısını 10^5 kob/g ve *E. coli* sayısını 10^4 kob/g olarak belirlemiştir. Ön işlemden geçirilmiş bitki materyali (infüzyonlar ve bitki çayları için kaynar su kullanılması gibi) ve internal kullanımı olan diğer bitki materyali için maksimum değerler sırasıyla aerobik bakteri için 10^7 ve 10^5 kob/g; küf-maya için 10^4 ve 10^3 kob/g; *Enterobacteriaceae* ve diğer gram negatif bakteri sayısı için 10^4 ve 10^3 kob/g; *E. coli* için 10^2 ve 10 kob/g şeklindedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Farmakopesinde kullanımdan önce kaynar su ile muamele edilecek bitkiler ile kurutulmuş veya toz haline getirilmiş bitkilerde maksimum aerobik bakteri için 10^5 kob/g, küf-maya için 10^3 kob/g ile *Enterobacteriaceae* ve diğer gram negatif bakteriler için 10^3 kob/g; tentürler, toz halinde bitkisel özütler, sıvı özütler ve bitkisel besin takviyelerde aerobik bakteri için 10^4 kob/g ve küf-maya için 10^2 kob/g; infüzyonlar ve dekoksasyon uygulanan bitkisel ürünlerde aerobik bakteri için 10^2 kob/g ve küf-maya için 10 kob/g maksimum değerler belirlenmiştir. Tüm bitkisel formlarda *Salmonella* spp. ve *E. coli* bulunmaması istenmiştir. Avrupa Birliği (AB) Farmakopesinde kullanımdan önce kaynar su ilave edilen bitkisel tıbbi ürünler için (bir veya daha fazla ürün halinde; bütün, parçalanmış veya toz formunda) verilen mikrobiyal kontaminasyon sınırları: toplam aerobik bakteri 10^7 kob/g, küf-maya 10^5 kob/g ve *E. coli* 10^3 kob/g; kullanımdan önce kaynar su ilave edilmeyen bitkisel tıbbi

ürünler için: toplam aerobik bakteri 10^5 kob/g, küf-maya 10^4 kob/g; Enterobakteriler ve diğer Gram-negatif organizmalar 10^3 kob/g; *E. coli* ve *Salmonella* spp. olmamalıdır şeklindedir (11)

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde bitkiler ve bitki karışımları için *koagulaz pozitif Staphylococcus aureus* (n: 5, c: 2, m: 10^3 , M: 10^4), *Bacillus cereus* (n: 5, c: 2, m: 10^3 , M: 10^4) ve *Salmonella* spp. (n: 5, c: 0, M: 0/25g-ml); bitki çayları ve karışımları için ise küf-maya (n: 5, c: 2 m: 10^3 , M: 10^5) ve *Salmonella* spp. (n: 5, c: 0, M: 0/25g-ml) için limitler belirlenmiştir (12).

Farklı satış yerlerinde (market, aktar, baharatçı vb.) uygun olmayan ambalaj ve koşullarda satışa sunulabilen tıbbi bitki çaylarının mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi, üretim ve satış koşulları ile muhtemel sağlık risklerinin ortaya konulması açısından önemlidir. Bu çalışmada açık, yarı açık ve kapalı ambalajlarda satışa sunulan tıbbi bitki çaylarında bazı patojen bakterilerin varlığının ve mikrobiyolojik kalitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Bu çalışmada Diyarbakır ilinde tıbbi bitki çayı olarak satışa sunulan kekik, nane, rezene, adaçayı, ıhlamur, hatmi, sinameki, defne, civanperçemi ve anasondan oluşan toplam 120 örnek mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Bitki çayları aktar, market ve süpermarketlerde açık, yarı açık ve kapalı ambalajlarda satışa sunulan çaylar olarak üç farklı grup şeklinde satın alınmış ve analiz edilmiştir. Açık ve yarı açık gruptaki her bir örnek farklı satış yerinden, kapalı gruptaki örnekler ise farklı markaların aynı olmayan partilerinden seçilmiştir. Her bitki çayı grubunda (açık, yarı açık ve kapalı) 4'er örnek ve toplamda her bitkiden 12 örnek alınmıştır. Açık bitki çayları dökme olarak satışa sunulan ve herhangi bir ambalaj içerisinde bulunmayan çaylardır. Yarı açık olarak tanımlanan bitki çayları satış yerlerine büyük ambalajlarda getirilen ve satış yerlerinde değişik dönemlerde ambalajları açılarak farklı gramajlarda plastik poşetlere (polietilen) konularak yeniden paketlenen çaylardır. Bu çayların konuldukları plastik poşetlerin ağzı, çayların dökülmesinin önlenmesi amacıyla genellikle zımba veya yapışkan bant ile kapatılmıştır ve poşetler tamamen kapalı değildir. Kapalı olarak tanımlanan bitki çayları ise orijinal ambalajları içerisinde ve markalı olarak satışa sunulan çaylardır. Tüm bitki çayı örnekleri en kısa süre içerisinde Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarlarına getirilerek analizleri yapılmıştır.

Mikrobiyolojik analizler

Mikrobiyolojik analizler için aseptik koşullarda alınan 25 g örnek üzerine 225 ml peptonlu su eklenmiştir. Bu homojenizattan 1 ml alınarak dilüsyonlar yapılmış ve uygun besiyerlerine ekimler gerçekleştirilmiştir.

Toplam mezofilik aerob bakteri (TMAB) sayısının saptanması için Plate Count Agar'a (PCA, Merck 1.05463) ISO 4833-1:2013 (13), *Enterobacteriaceae* sayısı için Violet Red Bile

Glucose Agar'a (VRBD, Oxoid CM485) ISO 21528-2:2017 (14), koliform sayısı için Violet Red Bile Lactose (VRBL) Agar'a ISO 4832:2006 (15), *E. coli* sayısı için Tryptone Bile X-Glucuronide Medium'a (TBX, Oxoid CM945) ISO 16649-2:2001 (16), *B. cereus* izolasyonu için Mannitol-Egg Yolk-Polymixin Agar'a (MYP, Merck 1.05267) ISO 7932:2004 (17) ve küf-maya sayısı için Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar'a (DRBC, Merck 1.00466) BAM (2011) (18) standart yöntemleriyle ekim ve değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir.

Salmonella spp. varlığının belirlenmesi amacıyla TSE ISO 6579 (19) standart analiz yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Aseptik koşullarda alınan 25 g örnek üzerine 225 ml tamponlanmış peptonlu su (Oxoid CM509) eklenerek ön zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda homojenizattan 0.1 ml alınarak Rappaport Vassiliadis Enrichment Broth'ta (Oxoid CM0669) selektif zenginleştirme amacıyla 41.5 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Zenginleştirme işlemi sonunda selektif katı besiyeri olarak hem XLD Agar'a (Merck 1.13919)) hem de Supplement (Merck 1.08981) ilave edilen XLT4 Agar'a ekim yapılarak 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. XLD Agar'da merkezi siyah olan kırmızı renkte ya da siyah üreyen koloniler, XLT Agar'da ise siyah merkezli koloniler değerlendirilmiştir. Şüpheli kolonilerin onaylanması amacıyla Triple Sugar Iron Agar (Oxoid CM277), Üre Broth (Oxoid CM71) ve Lysine Iron Agar'a (Oxoid CM381) ekimler yapılmış ve sonuçlar yorumlanmıştır. Şüpheli koloniler son aşamada Salmonella Latex Test Kiti (Oxoid FT0203A) ve Vitek 2 Compact (Biomerieux®) otomatik bakteri tanımlama cihazı kullanılarak doğrulanmıştır.

S. aureus sayımı için Baird-Parker Agar Base (BP, Merck 1.05406) üzerine Egg Yolk Tellürit (Merck 1.03785) eklenerek besiyeri hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan alınan 0,1 ml örnek steril besiyeri yüzeyine steril cam drijalski spatülü ile yayılmıştır. 37 °C'de 24-48 saat inkübasyon sonunda 1-3 mm çapında parlak siyah renkli, etrafında bulanık bir hale bulunan koloniler sayılmıştır (20). BPA'da gelişen siyah ve etrafında lesitinaz halkası bulunmayan koloniler ise *Staphylococcus-Micrococcus* spp. olarak değerlendirilmiştir.

Salmonella spp., *E. coli*, *B. cereus* ve *S. aureus* identifikasyonunda standart analiz yöntemlerine ilave olarak besiyerinde tipik özelliklerde üreme gösteren şüpheli koloniler doğrulama amacıyla Vitek 2 Compact (Biomerieux®) otomatik bakteri tanımlama cihazında çalışılmıştır. Şüpheli koloni sayısının 3'ten az olduğu durumlarda kolonilerin tamamı, fazla olduğu durumlarda ise 3'er şüpheli koloni alınmıştır. Bu cihazın kullanımında şüpheli bakteriye uygun kartlar kullanılmıştır (Gram pozitif, Gram negatif veya BCL kartı).

Sülfid indirgeyen anerob bakteri (SIAB) sayımında Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar'a (SPS) roll-tube tekniği ile ekimler yapılmıştır. Steril tüplere uygun dilüsyondan aseptik koşullarda 1 ml alınarak üzerine iki kat SPS agar eklenmiştir. 37 °C'de 24-48 saatlik inkübasyon sonunda siyah misket şeklindeki koloniler sayılmıştır (21).

İstatistik

Çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 22 (IBM SPSS, IBM Corporation, USA) paket programı ile yapılmıştır. Mikrobiyolojik veriler log₁₀ kob/g şekline dönüştürülmüştür. Normallik analizi sonuçlarına göre verilerin parametrik test varsayımlarını karşıladığı tespit edilmiştir. Bitki çayı örnekleri ayrıca bitki × ambalaj (açık, kapalı, yarı açık) (10 × 3 düzende) General Linear Model (GLM) prosedürüne uygun şekilde varyans analizine tabi tutulmuştur. İstatistiksel önem seviyesi P<0.05 olarak kabul edilmiş ve veriler ortalamaya ± standart sapma olarak verilmiştir.

BULGULAR

Tıbbi bitki çaylarında ortalama TMAB, *Enterobacteriaceae*, koliform ve küf-maya sayısı Tablo 1'de, kontaminasyon oranları ve pozitif örnek / toplam örnek sayısı Tablo 2'de verilmiştir. Analiz edilen örneklerdeki kontaminasyon oranları TMAB %95, küf-maya %90, *Enterobacteriaceae* %77.5, koliform %74.16, sülfid indirgeyen anaerob bakteri %42.5, *Staphylococcus-Micrococcus* spp. %14.17, *E. coli* %3.33 ve *Salmonella* spp. %2.5 olarak bulunmuştur. Örneklerin hiçbirinde *S. aureus* ve *B. cereus* varlığı tespit edilememiştir. Bu çalışmada analiz edilen bitki çaylarının %2.5'i *Salmonella* spp. ve %20.83'ü küf-maya varlığı açısından Türk Gıda Kodeksi'ne uygun değildir. *Salmonella* spp. ve *E. coli* bulunan örnekler ABD ve AB mevzuatına da aykırılık göstermektedir.

En yüksek ortalama TMAB sayısı nane örneklerinde, en yüksek *Enterobacteriaceae* ve koliform bakteri ortalaması ise hatmi örneklerinde bulunmuştur. En düşük ortalama TMAB sayısı adaçayı örneklerinde, en düşük *Enterobacteriaceae* ve koliform bakteri ortalaması ise sinameki örneklerinde bulunmuştur. Ortalama TMAB sayısı bakımından ambalajlama durumu etkisizken (P>0.05) bitki örnekleri arasında fark tespit edilmiştir (P<0.05). Adaçayı örneklerindeki TMAB sayısı ortalamaları diğer çaylardan önemli derecede düşüktür (P<0.05). GLM sonuçlarına göre TMAB sayısı bakımından bitki çayları ve ambalajlama arasında ilişki (etkileşim) tespit edilmedi (P>0.05).

Kapalı ambalajlarda satışa sunulan örneklerdeki ortalama *Enterobacteriaceae* ve koliform bakteri sayıları açıkta satışa sunulan örneklerdekenden önemli derecede daha düşüktür (P<0.05). GLM sonuçlarına göre *Enterobacteriaceae* ve koliform grup bakımından bitki çayları ve ambalajlama arasında ilişki (etkileşim) tespit edilmedi (P>0.05).

Küf-maya sayısı üzerine ambalajlama durumunun etkisi önemsiz (P>0.05) iken, bitki çayı türü küf-maya sayısı üzerine etkili (P<0.05) olarak bulunmuştur. En yüksek küf-maya sayısı hatmi örneklerinde (4.92±0.78 log₁₀ kob/g), en düşük sayı ise anason örneklerinde (2.65±0.64 log₁₀ kob/g) saptanmıştır. GLM sonuçlarına göre küf-maya sayısı bakımından bitki çayları ve ambalajlama arasında ilişki (etkileşim) tespit edilmiştir (P<0.05).

Tablo 1. Tıbbi bitki çaylarında ortalama TMAB, *Enterobacteriaceae*, koliform ve küf-maya sayıları (log₁₀ kob/g)

Bitki çayı	TMAB	<i>Enterobacteriaceae</i>	Koliform	Küf-maya
Kekik	4.23±0.90 ^{ab}	2.21±1.71 ^{bc}	2.15±1.70 ^{abc}	4.21±0.76 ^{ab}
Nane	5.03±1.19 ^a	3.76±1.66 ^{ab}	3.80±1.67 ^{ab}	4.78±1.11 ^a
Rezene	4.53±1.17 ^{ab}	3.01±1.35 ^{abc}	2.68±1.39 ^{abc}	3.30±1.12 ^{bcd}
Adaçayı	3.37±0.95 ^b	2.27±1.25 ^{bc}	2.11±1.11 ^{bc}	3.79±0.71 ^{abcd}
İhlamur	4.28±1.14 ^{ab}	3.18±1.24 ^{abc}	3.08±1.18 ^{abc}	4.00±1.40 ^{abc}
Hatmi	4.75±1.14 ^{ab}	4.19±1.29 ^a	3.87±1.26 ^a	4.92±0.78 ^a
Sinameki	4.13±0.84 ^{ab}	1.88±1.22 ^c	1.68±1.19 ^c	2.92±0.87 ^{cd}
Defne	3.67±0.76 ^{ab}	2.34±1.48 ^{bc}	2.00±1.62 ^c	4.41±1.29 ^{ab}
Civanperçemi	3.64±0.81 ^{ab}	2.13±1.36 ^{bc}	2.12±1.42 ^{abc}	3.74±0.95 ^{abcd}
Anason	3.95±0.85 ^{ab}	2.43±1.02 ^{bc}	2.46±0.98 ^{abc}	2.65±0.64 ^d
Ambalaj durumu				
Açık	4.29±1.00 ^x	3.25±1.25 ^x	3.15±1.30 ^x	4.13±0.93 ^x
Yarı açık	4.07±0.92 ^x	2.64±1.65 ^{xy}	2.48±1.55 ^{xy}	3.80±1.08 ^x
Kapalı	4.11±1.27 ^x	2.33±1.48 ^y	2.16±1.52 ^y	3.68±1.48 ^x
	P değeri	P değeri	P değeri	P değeri
Bitki	.004	.000	.000	.000
Ambalaj	.621	.009	.004	.077
Bitki x ambalaj	.980	.389	.518	.008

abcd: Aynı sütunda farklı üst simgelerle gösterilen değerler arasında istatistiksel fark vardır (bitki örneklerinin karşılaştırılması).

xyz: Aynı sütunda farklı üst simgelerle gösterilen değerler arasında istatistiksel fark vardır (ambalaj durumunun karşılaştırılması).

Tablo 2. Tıbbi bitki çaylarında kontaminasyon oranları (yüzde) ve pozitif örnek/toplam örnek sayısı

Mikroorganizma	Bitki çayları										
	Kekik	Nane	Rezene	Adaçayı	İhlamur	Hatmi	Sinameki	Defne	Civanperçemi	Anason	Toplam
TMAB	%100 12/12	%91.66 11/12	%91.66 11/12	%83.33 10/12	%91.66 11/12	%100 12/12	%100 12/12	%100 12/12	%100 12/12	%91.66 11/12	%95 114/120
<i>Enterobacteriaceae</i>	%58.33 7/12	%83.33 10/12	%83.33 10/12	%75 9/12	%91.66 11/12	%91.66 11/12	%58.33 7/12	%75 9/12	%66.66 8/12	%91.66 11/12	%77.5 93/120
Koliform	%50 6/12	%83.33 10/12	%83.33 10/12	%75 9/12	%91.66 11/12	%91.66 11/12	%50 6/12	58.33 7/12	%66.66 8/12	%91.66 11/12	%74.16 89/120
<i>E. coli</i>	%16.6 2/12	TE	TE	TE	%8.33 1/12	TE	TE	TE	TE	%8.33 1/12	%3.33 4/120
<i>Staphylococcus & Micrococcus spp.</i>	%0 0/12	%33.33 4/12	%25 3/12	%16.6 2/12	%0 0/12	%8.33 1/12	%8.33 1/12	%16.6 2/12	%16.6 2/12	%16.6 2/12	%14.17 17/120
<i>S. aureus</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Küf-maya	%100 12/12	%91.66 11/12	%75 9/12	%100 12/12	%83.33 10/12	%100 12/12	%83.33 10/12	%91.66 11/12	%100 12/12	%75 9/12	%90 108/120
<i>Salmonella spp.</i>	%8.33 1/12	TE	TE	TE	TE	%8.33 1/12	TE	TE	TE	%8.33 1/12	%2.5 3/120
<i>B. cereus</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
SIAB	%50 6/12	%83.33 10/12	%50 6/12	%16.6 2/12	%75 9/12	%25 3/12	TE	%50 6/12	%33.33 4/12	%41.66 5/12	%42.5 51/120

TE: Tespit edilmedi

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki çayları topraktan çıkan yaprak, gövde, çiçek, tohum, meyve, kabuk ve köklere yapışan çok sayıda mikroorganizma taşıyabilir. Genellikle hızlı bir şekilde yıkamaktan başka dekontaminasyon uygulanmadığından tıbbi bitki materyallerinin işlenmesi ve bitkisel çayların hazırlanması sırasında kontaminasyon oluşabilir (8).

Son zamanlarda kuru otlar ve çaylar dünya çapında *Salmonella* kontaminasyonu ve salmonelloz vakaları ile ilişkilendirilmiştir. Bu ürünler birincil üretim, işleme, depolama ve paketleme sırasında bakteriyel patojenlerle kontamine olabilir. *Salmonella* gibi patojenler bu düşük nemli ürünlerde uzun süre hayatta kalabilir. Son kullanıma bağlı olarak, yüksek ısı işlem görmeyen gıdalara kurutulmuş otlar

eklenirse veya çaylar nispeten soğuk demlenirse, bakteriyel patojenlerin varlığı gıda kaynaklı hastalıklar için potansiyel bir risk oluşturabilir. *Salmonella* spp. kontaminasyonu Nijerya'da tıbbi bitkisel ürünlerde %33 (22), bitkisel infüzyonlarda %9.5 (23), Kanada'da bitki çaylarında %0.08 olarak (24) olarak bulunmuştur. Kneifel ve Berger (4) tarafından anason, rezene, nane, kekik ve adaçayında yapılan çalışmada ise *Salmonella* spp. tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızda *Salmonella* spp. (%2.5) varlığı yarı açık ambalajlardaki kekik, hatmi ve anason örneklerinde tespit edilmiştir. Depolama veya satışın çeşitli dönemlerinde yapılan paketleme işlemlerinin bu kontaminasyonun nedeni olabileceği değerlendirilmektedir.

Enterobacteriaceae ve koliform bakteri gıda maddelerinin hijyenik durumu ve muhtemel patojen riski konusunda fikir vermesi nedeniyle analiz edilmektedir. Türkiye'de organik bitki çaylarında *Enterobacteriaceae* ve koliform varlığı sırası ile %97.29 ve %67.56 düzeyinde bildirilmiştir (25). İran'da kedi otu, rezene, meyan kökü ve kekik örneklerinde koliform kontaminasyonu %55 (7); Benin'de bitkisel çaylarda koliform kontaminasyonu %54 olarak bulunmuştur (8). Bizim koliform sonuçlarımız (%74.16) diğer araştırmalardan daha yüksek iken (7, 25), *Enterobacteriaceae* sonuçlarımız (%77) daha düşüktür (25).

E. coli fekal kökenli bulaşmaları gösteren hijyen indikatörü bir bakteridir. *S. aureus* ise gıdaların hijyenik durumunun ve özellikle personel kaynaklı bulaşmaların göstergesi olarak kullanılmaktadır. *E. coli* ve *S. aureus* kontaminasyonu Benin'de satılan bitki çaylarında %38 ve %46 (8); Nijerya'da bitki çayı örneklerinde %10 ve %90 (26); Nijerya'da çeşitli tıbbi bitkilerde %47.6 ve %71.4 (22), Pakistan'da %23.9 ve %9.3 (3) olarak bildirilmiştir. Türkiye'de 37 adet organik bitkisel çay örneğinin 33 (%89.19) tanesinde *S. aureus* saptanmıştır (25). İran'da kedi otu, rezene, meyan kökü ve kekik örneklerinde *E. coli* varlığı %31.2 olarak tespit edilmiştir (7). Kanada'da yapılan ve 1178 adet çayın incelendiği çalışmada hiçbir çay örneğinde *S. aureus* ve *E. coli* tespit edilememiştir (24). Bizim çalışmamızda da hiçbir örnekte *S. aureus* bulunamamıştır. Ancak kekik (yarı açık), kekik (açık), ıhlamur (açık) ve anason (açık) örneklerinde *E. coli* saptanmıştır (%3.3). Kapalı ambalajdaki hiçbir örnekte *E. coli* saptanmamıştır. Bizim sonuçlarımız kontaminasyon tespit eden tüm araştırma sonuçlarından daha düşüktür.

Küfler yaygın çevresel kontaminantlardır. Uygun sıcaklık ve nem koşullarında bitki çayları, baharatlar, tahıllar, kuru yemişler ve yağlı tohumlar gibi birçok üründe gelişme gösterirler (27). Çeşitli tıbbi bitkilerdeki küf kontaminasyonu Nijerya'da %57.1 (22), İran'da %77.5 (7), Portekiz'de %93.5 (28) olarak bulunmuştur. Türkiye'de bitki çaylarının %82'sinde küf-maya kontaminasyonu saptanmıştır. En yüksek küf-maya sayısı ıhlamurda (3.5×10^3 kob/g), en düşük ise kuşburnu örneklerinde (1.1×10^1 kob/g) bildirilmiştir (25). Bizim çalışmamızda incelenen örneklerin %90'ı küf-maya ile kontamine bulunmuştur. Bu sonuç Martins ve ark. (28) haricindeki diğer çalışmaların (7, 22, 25) sonuçlarından daha yüksektir. Küf kontaminasyonu bitki çaylarının toplanması, depolanması veya satışı aşamalarında gerçekleşmiş olabilir. Bitki çaylarının sıcak veya kaynar su ile demlenmesi pato-

jenler ve indikatör bakteriler için yeterli olsa bile aerob ve anaerob spor oluşturan bakteriler ile *S. aureus* toksinleri açısından risk ortadan kalkmaz. Portekiz'in Lizbon şehrinde, pazarlardan rastgele alınan papatya, portakal yaprağı, ıhlamur çiçeği, mısır püskülü, yosun, yabancı nane (yarpuz) ve adaçayından oluşan paketlenmiş şifalı bitkilerdeki *Clostridium perfringens* spor kontaminasyonu %83.9, *B. cereus* spor kontaminasyonu ise %96.8 olarak bulunmuştur (28). Bizim çalışmamızda bakterilerin spor formları analiz edilmiş, *B. cereus* ve sülfid indirgeyen anaerob varlığı araştırılmıştır. Sülfid indirgeyen anaerob bakteri kontaminasyon oranımız %42.5 olup, hiçbir örnekte *B. cereus* saptanamamıştır. Çeşitli çalışmalarda sonuçlarımızdan farklı olarak *B. cereus* kontaminasyonları bildirilmiştir. Kedi otu, rezene, meyan kökü ve kekik örneklerinde *B. cereus* %5 (7); rezene örneklerinde %33.3, kekik örneklerinde ise %66.7 oranında bildirilmiştir (4). Kanada'da yapılan ve 1178 adet çayın incelendiği çalışmada *B. cereus* kontaminasyonu %0.4 düzeyinde bulunmuştur (24). Güney Kore'de satılan bitkisel ürünlerde (n:194) yapılan bir çalışmada 491 izolat içerisinde *Bacillus* spp. varlığı %30.14 (148/491), *B. cereus* olarak tanımlanan izolat oranı ise %23 (34/148) olarak bildirilmiştir (29).

Bitkisel ürünler ve çaylar konusunda yapılan çalışmalarda kontaminasyon oranları açısından büyük farklılıklar görülmektedir. Bu durumun nedenleri arasında incelenen bitki türü, örnek sayısı, coğrafi bölge, işleme, depolama ve satış koşulları ile ambalaj durumu sayılabilir.

Bitki çaylarındaki mikroorganizma bulunma oranları kadar mikroorganizma sayıları da önemlidir. Mikroorganizma sayısı patojen bulunma ve gıdaların bozulma olasılığı ile gıdanın hijyenik durumu hakkında fikir vermektedir. Bitki çaylarında çoğunlukla toplam mezofilik aerob bakteri, küf-maya, *Enterobacteriaceae* ve koliform gibi hijyen indikatörü mikroorganizmaların sayıları analiz edilmiştir. Nijerya'da bitki çayı örneklerindeki (n: 26) bakteri sayısı $1.1 \times 10^1 - 4.8 \times 10^2$ kob/g; küf sayısı $1.1 \times 10^2 - 4.5 \times 10^5$ kob/g (26); Mısır'da kekik örneklerinde toplam bakteri sayısı 16.49×10^4 kob/g, küf-maya sayısı 42.26×10^3 kob/g (6); Nijerya'da bitkisel infüzyonlardaki toplam canlı bakteri sayısı 0 kob/mL- 25.0×10^8 kob/mL; küf sayısı $3.0 \times 10^6 - 3.5 \times 10^8$ kob/ml (23); nane ve kekik çaylarındaki aerobik bakteri sayıları sırasıyla, $3.1 \times 10^5 - 1.2 \times 10^7$ ve $9.2 \times 10^4 - 6.4 \times 10^5$ kob/g; küf-maya sayıları ise sırasıyla $1.3 \times 10^4 - 1.4 \times 10^5$ ve $7.0 \times 10^3 - 1.6 \times 10^4$ kob/g olarak bulunmuştur (1). Kneifel ve Berger (4) toplam aerobik mezofil bakteri ve *Enterobacteriaceae* sayısını sırasıyla anasonda 3.8×10^5 ve 1.0×10^3 kob/g, rezenede 2.7×10^4 ve 2.4×10^3 kob/g, nanede 4.0×10^3 kob/g ve <10, adaçayında 2.0×10^5 kob/g ve <10, kekikte 5.1×10^6 ve 4.5×10^5 kob/g olarak bildirmiştir. İran'da kurutulmuş bitkilerde yapılan bir çalışmada nane ve kekikte toplam bakteri sayısı sırası ile 1.81×10^3 ve 3.8×10^3 kob/g; koliform sayısı ise sırasıyla 7.24×10^1 ve 0.92×10^1 kob/g olarak bulunmuştur (5). Mikroorganizma sayıları çalışmalara göre $0 - 10^8$ arasında geniş bir dağılım göstermektedir. Örnek çeşidi, örnek sayısı, coğrafi bölge, toplama, işleme ve muhafaza koşullarının sonuçlardaki farklılıklara neden olması muhtemeldir. Bizim çalışmamızda incelenen örneklerin %20.83'ü Türk Gıda Kodeksi'nde

belirtilen maksimum limitin üzerinde küf-maya sayısına içermektedir.

Tıbbi bitkiler için iyi tarım ve toplama uygulamaları, bitkisel tıbbi ürünlerin güvenliğinin ve etkinliğinin doğrudan bağlı olduğu kalite güvencesinde sadece ilk adımdır. Bu uygulamalar aynı zamanda tıbbi bitkilerin doğal kaynaklarının sürdürülebilir kullanım için korunmasında önemli bir rol oynayacaktır (3). Tıbbi bitkilerde patojen bakteriler hasat, kurutma, depolama, işleme ve toprak gibi kaynaklardan köken alabilir. Bu nedenle üreticiler son ürünün kalitesini, güvenliğini ve etkinliğini korumak için üretim sırasında mümkün olan en yüksek hijyen seviyesini ve bitkisel ürünlerde mümkün olan en düşük düzeyde patojen organizma varlığını sağlamalıdır (3, 30).

Bu çalışmada tıbbi bitki çaylarının mikrobiyolojik kalitesinin düşük olduğu ve patojen kontaminasyonu saptanmıştır. Bitki çaylarının toplanması, kurutulması, depolanması, satış ve ambalajlama aşamalarında iyi üretim ve hijyenik üretim uygulamalarına uyulması önerilmektedir. Ambalaj durumunun hijyenik kalite üzerinde bazı bakteriler açısından etkili olduğu saptanmıştır. Yeni kontaminasyonların önlenmesi ve mikroorganizmaların gelişiminin sınırlandırıldığı ambalajlarda ve uygun muhafaza ve satış koşullarında tutulan çaylar halk sağlığı açısından daha güvenli olacaktır. Yüksek küf kontaminasyonu içerisinde hangi küf türlerinin bulunduğu ve bunların mikotoksin üretme durumları ayrı bir çalışma konusu olarak ele alınmalıdır. Doğal olarak kabul edilip şifa amacıyla kullanılan bitki çaylarının evlerdeki muhafaza koşulları (sıcaklık, nem vb.), demleme sıcaklık ve süreleri gibi kullanım şekilleri konusunda toplumun bilgilendirilmesi ve ambalajlarında kullanım bilgilerinin eksiksiz yer alması sağlanmalıdır. Bitki çaylarında biyolojik tehlikelerin olabileceği göz önüne alınarak uygun şekilde hazırlanmaları (kaynatma, kaynamış suda yeterli süre bekletilmesi vb.) ve tüketilmeleri halk sağlığı açısından oldukça önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından Veteriner 19.001 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Tournas VH, Katsouda EJ. (2008). Microbiological Quality of Various Medicinal Herbal Teas and Coffee Substitutes. *Microbiol Insights*. 1: 48-55.
2. Can N, Duraklı Veliöğlu S. (2018). Bitki Çaylarında Mikrobiyal Kalite ve Mikotoksin Varlığı. *Erzincan Üniv Fen Bilim Enst Derg*. 11(3): 362-380.
3. Malik F, Hussain S, Mahmoo S. (2014). Appraisal of Medicinal Plants Used in Alternative Systems of Medicines for Microbial Contamination, Physicochemical Parameters and Heavy Metals. *Pak J Bot*. 46(2): 645-658.
4. Kneifel W, Berger E. (1994). Microbiological Criteria of Random Samples of Spices and Herbs Retailed on the Austrian Market. *J Food Prot*. 57(10): 893-901.
5. Alavi I, Zahedi M, Zahedi M, Pirbalouti AG, Rahimi E, Momtaz H. (2017). Evaluating the Microbial Contamination of Some

- Iranian Dried Medicinal Plants and Distillates. *Int J Epidemiol Res*. 4(2): 118-124.
6. Abd El-Rahman MAM. (2019). Microbiological Quality and Heavy Metals Content of some Spices and Herbs Kinds. *J Food and Dairy Sci Mansoura Univ*. 10 (7): 237-241.
7. Ameri A, Ekhtelat M, Shamsaei S. (2020). Microbial Indices of Industrial and Traditional Medicinal Herbs in Ahvaz, Iran. *Foods and Raw Materials*. 8(1): 134-139.
8. Adoukpe FM, Allabi AC, BabaMoussa F, Gbegbe M, Keke M, Moutairou K. (2017). Microbiological Quality Assessment of Aqueous Herbal Teas Sold in Cotonou, Benin. *Int J Herb Med*. 5(3): 121-126.
9. Garcia S, Iracheta F, Galvan F, Heredia N. (2001). Microbiological Survey of Retail Herbs and Spices from Mexican Markets. *J Food Prot*. 64(1): 99-103.
10. Wilson C, Dettenkofer M, Jonas D, Daschner FD. (2014). Pathogen Growth in Herbal Teas in Clinical Settings: A Possible Source of Nosocomial Infection. *Am J Infect Control*. 32: 117-119.
11. de Freitas Araújo MG, Bauab TM. (2012). Microbial Quality of Medicinal Plant Materials. Akyar I (Editor), in *Latest Research into Quality Control*. Chapter 4. eBook (PDF) ISBN: 978-953-51-5141-8. p. 67-81.
12. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. (2011). Gıda Güvenilirliği Kriterleri. Resmi Gazete Tarihi: 29 Aralık 2011, Resmî Gazete Sayı: 28157.
13. ISO 4833-1. (2013). Microbiology of the Food Chain - Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms - Part 1: Colony Count at 30°C by the Pour Plate Technique. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
14. ISO 21528-2. (2017). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Enterobacteriaceae*. Part 2: Colony - Count Technique. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
15. ISO 4832:2006. (2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
16. ISO 16649-2. (2001). Horizontal Method for the Enumeration of β - glucuronidase Positive *E. coli* - Colony Count Technique at 44 °C Using. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
17. ISO 7932:2004. (2004). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of Presumptive *Bacillus cereus* – Colony Count Technique at 30 Degrees. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
18. Bacteriological Analytical Manual. (2001). BAM: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Erişim: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-yeasts-molds-and-mycotoxins>. Erişim Tarihi: 06.09.2019.
19. TSE ISO 6579. (2005). Mikrobiyoloji - Gıda ve Hayvan Yemleri - *Salmonella* İçin Yatay Yöntem. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
20. Harrigan WF. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3th Ed. Academic Press, San Diego.
21. Speck ML. (1976). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington DC, USA.

22. Okunlola A, Adewoyin BA, Odeku OA. (2007). Evaluation of Pharmaceutical and Microbial Qualities of Some Herbal Medicinal Products in South Western Nigeria. Trop J Pharm Res. 6 (1): 661-670.
23. Bala JD, Kuta FA, Abioye OP, et al. (2017). Isolation and Characterisation of Microorganisms Contaminating Herbal Infusion Sold in Minna, Nigeria. Int J STEM Educ. 13(2): 10-15.
24. The Canadian Food Inspection Agency. Bacterial Pathogens in Dried Herbs and Dried Teas - April 1, 2014 to March 31, 2018. Food microbiology - Targeted Surveys - Final Report. Erişim: https://www.inspection.gc.ca/DAM/DAM-food-aliments/STAGING/text-exte/bacterial_pathogens_in_dried_herbs_and_dried_tea_15_53013196262_eng.pdf Erişim Tarihi: 26.04.2020.
25. Arslan R. (2013). Türkiye’de Üretilen Bazı Organik Baharat ve Bitkisel Çayların Aflatoksin B1 Düzeyleri Ve Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Manisa, s,1-113.
26. Omogbai BA, Ikenebomeh M. (2013). Microbiological Characteristics and Phytochemical Screening of some Herbal Teas in Nigeria. European Sci J. 9(18): 149-160.
27. Romagnoli B, Menna V, Gruppioni N, Bergamini C. (2007). Aflatoxins in Spices, Aromatic Herbs, Herb-Teas and Medicinal Plants Marketed in Italy. Food Control. 18: 697-701.

28. Martins HM, Martins ML, Dias MI, Bernardo F. (2001). Evaluation of Microbiological Quality of Medicinal Plants Used in Natural Infusions. Int J Food Microbiol. 68: 149-153.
29. Ham H. (2017). Distributions of *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and Coliforms Isolated from Agricultural Herb Products from the Market. J Bacteriol Virol. 47(4): 171-178.
30. Abba D, Inabo HI, Yakubu SE, Olonitola OS. (2009). Contamination of Herbal Medicinal Products Marketed in Kaduna Metropolis with Selected Pathogenic Bacteria. Afr J Trad CAM. 6(1): 70-77.

✉ **Yazışma adresi:**

Prof. Dr. Aydın VURAL
Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin-Gıda Hijyeni ve
Teknolojisi Anabilim Dalı, 21280, Sur-Diyarbakır
E-mail: avural@dicle.edu.tr