

GIDA MADDELERİNDE *SALMONELLA* ARANMASINDA LAKTOZ BROTH VE TAMPONLANMIŞ PEPTONLU SU İLE ÖNZENGİNLEŞTİRME SÜRESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Hilal Selamoğlu¹, A. Kadir Halkman^{2}**

¹A. O. Ç. Süt Fabrikası, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gölbaşı, Ankara, Türkiye

Geliş / *Received*: 17.05.2017; Kabul / *Accepted*: 31.05.2017; Online baskı / *Published online*: 08.06.2017

Selamoğlu, H., Halkman, A.K. (2017). Gıda maddelerinde *Salmonella* aranmasında laktoz broth ve tamponlanmış peptonlu su ile önzenginleştirme süresinin karşılaştırılması. GIDA (2017) 42 (4): 457-467 doi: 10.15237/gida.GD17046

Öz

Bu çalışmada, gıdalarda *Salmonella* aranması amacıyla, önzenginleştirme aşamasında ISO tarafından önerilen tamponlanmış peptonlu su ile FDA tarafından kimi gıdaların analizi için önerilen laktoz broth, *S. Enteritidis* ATCC 13076 ve *S. Typhimurium* ATCC 13311 olmak üzere iki farklı *Salmonella* serotipi için denenmiştir. Çalışmada, refakatçi flora olarak *Escherichia coli* ATCC 10536 suşu kullanılmıştır. Işınlanarak sterilize edilmiş kıyma ve UHT süt, ayrı ayrı olmak üzere *S. Enteritidis* + *E. coli* ve *S. Typhimurium* + *E. coli* ile bulaştırılmış, 37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 15, 18, 21 ve 24. saatlerinde *Salmonella* ile *E. coli* sayımları selektif besiyeri kullanılarak yapılmış ve aynı zamanda pH değerleri ölçülmüştür. Denemelerin 2. aşamasında, *Salmonella* serotipleri asetik asit ile zayıflatılmış ve yukarıda belirtilen şekilde devam edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, tamponlanmış peptonlu suda pH stabil kalmış ($P > 0.05$) ancak laktoz brotha pH düşmüştür ($P < 0.05$). pH'nın düşmesi *Salmonella* serotiplerinin tümüyle yok olmasına yetecek kadar olmamıştır ve her koşulda *Salmonella* sayımı gerçekleştirilmiştir. *S. Typhimurium* serotipi özellikle laktoz brotha *S. Enteritidis* serotipine kıyasla daha düşük ($P < 0.05$) sayım sonucu vermiştir. Tüm denemelerde ilerleyen inkübasyon süresine bağlı olarak laktoz brotha pH düşmesi olmakla beraber, bu düşüşün *Salmonella* sayısında önemli bir etkisi olmamıştır ($P > 0.05$).

Anahtar kelimeler: *Salmonella*, önzenginleştirme, tamponlanmış peptonlu su, laktoz broth

COMPARISON OF THE PRE-ENRICHMENT TIME IN USING LACTOSE BROTH AND BUFFERED PEPTONE WATER FOR *SALMONELLA* DETECTION IN FOODS

Abstract

In this study; the usage of buffered peptone water recommended by ISO for pre-enrichment step for *Salmonella* detection in foods and lactose broth recommended by FDA for the analysis of some foods, was tested for the analysis of for two different serotypes of *Salmonella* (*S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Typhimurium* ATCC 13311). *Escherichia coli* ATCC 10536 strain was used as an competitive flora in the study. The irradiated minced meat and UHT milk were separately contaminated with *S. Enteritidis* + *E. coli* and *S. Typhimurium* + *E. coli* and incubated at 37 °C for 24 hours. *Salmonella* and *E. coli* counts were performed at 15th, 18th, 21st, and 24th hours of incubation by using selective medium and pH values were measured at the same time. In the second step of experiment, *Salmonella* serotypes were attenuated with acetic acid and the study was continued as described above. According to the results of the study, the pH value in buffered peptone water was stable ($P > 0.05$) but, the same value was decreased in lactose broth ($P < 0.05$). The decrease in pH was not enough to completely inhibit *Salmonella* serotypes and *Salmonella* counts were performed under all conditions. The serotype *S. Typhimurium* serotype showed lower ($P < 0.05$) counts than the serotype *S. Enteritidis* in lactose broth. In all steps, due to the duration of incubation in all experiments there was a decrease in pH value in lactose broth but, this decrease was not a significant effect on *Salmonella* count ($P > 0.05$),

Keywords: *Salmonella*, pre-enrichment, buffered peptone water, lactose broth

* Bu çalışma, birinci yazarın YL tezi özetidir / *This paper is the summary of first author's M. Sc. thesis*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*

✉ halkman@ankara.edu.tr, © (+90) 0312 203 3300/3614-3625, ☎ (+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Salmonella, *Enterobacteriaceae* üyesi olup, genellikle koliform grup bakteriler tarafından yoğun şekilde kontamine olmuş gıdalarda rastlanır (Halkman vd., 1994; Montville ve Mathews, 2007). *Salmonella* cinsi; somatik, flagellar ve kapsüler antijen tiplendirmesine dayalı olarak 2600'e yakın serotipten oluşmaktadır. (Erol, 2007; Torlak, 2011). *Salmonella* spp. için gelişme sıcaklık aralığı 5-46 °C ve optimum gelişme sıcaklığı 35-37 °C'tir. 4-11 gibi geniş bir pH aralığında gelişme gösterirken, en uygun gelişme pH'sı ise 7.4'tür (Halkman vd., 1994; Aytaç ve Taban, 2010). Çeşitli karbohidratlardan asit ve/veya gaz oluştururlar, sitrati tek karbon kaynağı olarak kullanırlar, H₂S üretirler, lizin ve ornithini kadaverin ve putresine dekarboksile ederler, oksidaz negatif, katalaz pozitifler. Laktoz, sakkaroz ve üreyi metabolize edemezler. Bazı atipik *Salmonella* biyotipleri ise lizini dekarboksile edemezken, laktoz, sakkaroz ve üreyi kullanabilirler (Doğan, 1993; Vazgeçer ve Temiz, 2005; Ray ve Bhunia, 2016).

Salmonella cinsi, 2600 kadar farklı serotip içermesine karşın, bunlardan sadece 50 kadarı insanlarda patojenite gösterir. Hastalığa yol açan serotiplerin içinde *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* en önemli olanlardır. Bugün kayıtlara geçmiş şekli ile gıda kaynaklı hastalık etmenleri arasında en fazla hastalanmaya yol açan patojen, *Campylobacter jejuni* iken, patojenik *Salmonella* serotipleri en fazla ölüme neden olanlardır (D'aust, 1997; Zorba, 2010; Ray ve Bhunia, 2016).

Gıda kaynaklı hastalıklar ve ölümlere yol açması nedeni ile halk sağlığı açısından bugün üzerinde en çok çalışılan gıda kaynaklı patojenlerden birisi, *Salmonella* spp.'dir. TS EN ISO 6579/A1'e göre standart analizi, 25 g-mL gıda numunesinde var/yok şeklinde yapılır (Anonymous, 2010). Bu standarda göre, selektif olmayan tamponlanmış peptonlu su (TPS) besiyerinde 18 saat önzenginleştirme, Rappaport-Vassiliadis (RVS) broth ve Muller-Kauffman tetrathionate-novobiocine (MKTTn) broth olmak üzere 2 farklı selektif besiyerinde 24 saat süre ile selektif zenginleştirme ve ardından her iki selektif zenginleştirme besiyerinden birisi xylose lysine deoxycholate (XLD) agar ve diğeri kullanıcının tercihinine

birakılmış olmak kaydı ile 2 farklı selektif katı besiyerine sürme ve 24 saat inkübasyon yapılır. Selektif katı besiyerlerindeki inkübasyon sonunda 4 Petri kutusundan bir adedinden dahi *Salmonella* izole edilirse analiz edilen numunede *Salmonella* şüphesi var olarak analiz sonuçlandırılır. Agarlı besiyerinde tipik morfolojide *Salmonella* kolonisi görülmesi yeterli değildir. Biyokimyasal testler uygulanarak tanımlama devam eder ve en son olarak polivalan antiserum ile *Salmonella* tanımlaması biter. Standart gıda analizinde serotiplendirmeye gerek duyulmaz ve izolatin patojen olup olmadığı araştırılmaz. Bununla birlikte, özellikle salgınlarda klinik mikrobiyoloji kayıtları açısından hangi serotipin etmen olduğu genellikle araştırılır (Erol, 2007; Halkman, 2013). Ancak yeni Avrupa gıda yasalarına göre kanatlı hayvan etlerinde *Salmonella* bulunursa, bunun *S. Enteritidis* veya *S. Typhimurium* olup olmadığı önemlidir (Anonymous, 2017).

Salmonella spp.'nin bir yandan halk sağlığı açısından yüksek önemi diğer yandan gıda sanayisinde stok maliyetleri nedeni ile olabildiğince hızlı ve doğru bir şekilde analiz edilmesi gereklidir. Bu amaçla, analiz süresini kısaltmayı hedefleyen immunokromatografik analiz yöntemleri yanında genetik esaslı testler ile tanımla süresi kısaltılmakta ve sonuç daha kesin bir şekilde alınmaktadır. Benzer şekilde, immunomanyetik separasyon (IMS), 1980'li yılların başından beri kullanılmaktadır. Yeni ve hızlı analiz teknikleri arasında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemleri kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır (İbrahim vd., 1986; Holbrook vd., 1989; Tsai ve Slavik, 1991; Mercanoglu ve Griffiths, 2005; Myint vd., 2006; Ahmed, vd., 2014; Liandris vd., 2014).

Salmonella ve diğer patojenlerin analizinde hızlı yöntemlere, özellikle gıda sanayisinde rağbet artmakla birlikte, bugün için yasal analiz yöntemi International Standard Organisation (ISO) ve Food and Drug Administration (FDA) gibi uluslararası kuruluşlar tarafından önerilen klasik kültürel yöntemdir.

Özellikle en önemli gıda kaynaklı patojen olan *Salmonella* analizinde modifikasyon amaçlı olarak her yıl çok sayıda araştırma makalesi yayımlanmaktadır (Hoorfar ve Baggesen, 1998; Daquigan vd., 2016; Jean-Gilles Beaubrun, 2016; Poltronieri vd., 2016).

Gıdalardaki patojen analizlerinde en büyük sorunlardan biri, aranan bakterinin stres altında olmasıdır. Gerek selektif zenginleştirme sıvı besiyerleri gerek zenginleştirme sonrası kullanılan selektif katı besiyerleri, refakatçi floranın gelişmesini baskılayacak çeşitli inhibitör maddeler içerir. Bu selektif maddeler, hedef mikroorganizmanın gelişmesini minimum düzeyde baskılayarak, refakatçi florayı maksimum düzeyde baskılayarak selektif inhibitory ile kasıt budur. Bir diğer deyiş ile bu kimyasallar geniş spektrumlu antibiyotik değildir. Besiyerlerindeki derişimleri, hedef bakteriye minimum zarar verecek kadardır. Ancak, eğer hedef bakteri stres altında ise, bu kimyasalların varlığından olumsuz etkilenir ve selektif besiyerinde gelişemez. Sonucun sahte negatif olarak alınmasındaki temel nedenlerden birisi budur (Anonymous, 2005).

Gıdaların soğutulması, dondurulması, kurutulması, asitle muamelesi, koruyucu madde ilavesi, düşük dozda radyasyona maruz bırakılması gibi uygulamalar sonucunda, gıdadaki mikroorganizmalar strese girer. Stresin boyutu mikroorganizma türüne ve uygulanan stres faktörünün derişimine göre değişir. *Salmonella*, çevresel olumsuzluklara karşı sporsuz bir bakteri olması nedeni ile çok yüksek bir direnç göstermez ve stres altına girer (Doğan vd., 1994; Juneja vd., 2016). Bu sorundan kurtulmak için patojen analizlerinde bir ya da daha fazla (ardışık) zenginleştirme veya canlandırma işleminden sonra selektif katı besiyerine ekim uygulaması vardır.

Bakterinin hassasiyetine, çevresel faktörlerden ve/veya gıda işlemleri sırasında gördüğü olası zararlara göre selektif olmayan ön zenginleştirme ve arkasından selektif zenginleştirme olabileceği gibi doğrudan selektif zenginleştirme de olabilir (Pignato vd., 1995; Halkman, 2013; Lee vd., 2015).

ISO, 25 g-mL gıda numunesinde *Salmonella* spp. bulunmaması gerektiği için, 25 g-mL gıdanın incelenmesi gerektiğini bildirmiştir. Bu nedenle *Salmonella* belirleme yöntemlerinde gıdanın 25 g-mL'sinde bulunabilecek bir tek *Salmonella* hücrelerini belirlemesi gerekmektedir (Telli, 2006; Yuk vd., 2014; Anonymous, 2016a).

Bu amaçla gıda numunesi, selektif olmayan bir ortamda 16-24 saat süre ile inkübasyona bırakılır. *Salmonella* aranmasında önzenginleştirme

amacıyla ISO'ya göre gıdalarda TPS önerilirken, FDA, kurutulmuş yumurta sarısı ve beyazı ile bunları içeren kek, bisküvi, makarna, ekmek benzeri ürünlerde, süt, ayran, peynir mayası, peynir, taze, donmuş ve kurutulmuş sebze ve meyveler, et, et ikameleri, balık gibi çeşitli gıdalarda laktöz broth (LB) besiyeri kullanılmasını önermektedir (Anonymous, 2016b).

Dünyanın önde gelen kuruluşlarından biri olan FDA tarafından yayınlanan Bacteriological Analytical Manual (BAM)'in *Salmonella* aranması amacıyla farklı gıdalarda önzenginleştirme için LB besiyerinde 35 °C'ta 24±2 saat inkübasyon önermekte iken (Anonymous, 2016b), ISO ise TPS ile 35-37 °C'ta 16 saatten az 20 saatten çok olmamak üzere önzenginleştirme yapılması gerektiğini belirtmektedir (Anonymous, 2002).

Salmonella geri kazanılmasında önzenginleştirme ortamlarının seçimi kadar, inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları da önemlidir. Önzenginleştirme aşamasında inkübasyon süresinin kısaltılması, stres veya hasarlı hücrelerin onarımına yetmediği için tavsiye edilmemektedir (Halkman vd., 1994; Pignato vd., 1995; Zorba, 2010).

Salmonella analizinde ISO 6579'a göre hiçbir selektif inhibitör içermeyen ve refakatçi floranın olası olumsuz pH değişmelerine karşı tamponlanmış olan önzenginleştirme besiyeri kullanılır (Anonymous, 2002). Burada amaç eğer analiz edilen gıdada hasar görmüş *Salmonella* varsa, bakterinin hasarı onarmasıdır. Refakatçi floradaki sayı artışı önemsenmez.

LB bileşiminde bulunan laktöz, koliformlar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılır ve sonuçta besiyerinde asitlik giderek artar. Bu asitliğin, aktif *Salmonella* üzerinde bile ve özellikle uzun süren inkübasyonda, olumsuz bir etki yapacağı beklenebilir. Dolayısıyla, *Salmonella*, izleyen selektif zenginleştirme aşamasına aktif değil, stres altında girebilir. Bunun anlamı ise, muhtemel sahte negatif sonuçlardır (Al-Nabulsi vd., 2014; Burin vd., 2014). Rathnayaka (2011), *Salmonella* analizinde önzenginleştirmenin önemine dikkat çekmiştir.

Patojen *Salmonella* serotiplerine en çok rastlanılan gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler gelmektedir (Var ve Evliya, 1995; Timme vd., 2012; Ahn vd., 2013). Hammadde, işleme teknolojisi ve depolama/ pazarlama koşulları *Salmonella* riskinin

daha da artmasına neden olmaktadır (D'aust, 1997; Torlak vd., 2013). Bu alışma kapsamında seçilen gıdalar, hayvansal ve işlenen ürünlerdir. Ayrıca bileşimlerinde bulunan farklı organik maddelerden, mikrofloradaki bakteri türlerinin gelişimi sırasında farklı metabolitlerin oluşması beklenmektedir.

Salmonella, gıda kaynaklı ölümlere en fazla neden olan patojen olması nedeniyle gıda mikrobiyolojisini en fazla ilgilendiren bakteridir (Trampel vd., 2014). Buna bağlı olarak gıdalardaki varlığı doğru bir şekilde analiz edilmeli, özellikle sahte negatif sonuçlardan kaçınılmalıdır. Bu çalışmanın amacı ISO ve FDA yöntemlerini kıyaslamak değil, sadece önzenginleştirme amacıyla kullanılan TPS ve LB besiyerlerinin kıyaslanmasıdır. Nitekim selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerleri, ISO yöntemine göre devam etmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Kültürler

Denemelerde gıda numunelerinden geri alma amacıyla kullanılacak olan *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 13311 ve *E. coli* ATCC 10536 suşları, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Bu bakterilerin seçilme amacı, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* serotiplerinin gıda kaynaklı hastalık ve ölümlerde en yaygın görülen serotipler olmasıdır. Analiz edilecek gıda numunesinde sadece *Salmonella* varsa önzenginleştirme besiyerinin ne olduğu hiç önemli değildir. Ancak bu araştırmanın temelini oluşturan sorgulama, refakatçi flora varlığı durumunda *Salmonella* serotiplerinin davranışını belirlemektir. Bu amaçla refakatçi florayı temsil etmek amacı ile *E. coli* seçilmiştir.

Geri Alma Denemesi Materyali

Bu çalışmada, geri alma denemesi materyali olarak et ve süt olmak üzere iki farklı gıda kullanılmıştır. Denemeler boyunca sadece tarafımızca kullanılan mikroorganizmaların dışında mikroflora olmaması amacıyla; ticari bir firmaya ait UHT süt tercih edilmiş, kıyma rneği ise Ankara piyasasından sağlanmış, 25 g tartılıp, alüminyum folyo ile

paketlenerek Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde 10 kGy doz değerinde işinlanarak sterilize edilmiştir.

Yöntem

Aktif Mikroorganizma Kltrlerindeki Sayının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak olan mikroorganizmalar, tryptic soy brotha (TSB; Merck 1.05459) aşılanıp, 37 C'ta 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmişlerdir (Kang vd., 2015). Inkübasyon sonrası maximum recovery diluent (MRD; Merck 1.12535) içeren tüplerde 1:9 oranında standart yöntemle seyreltmeler yapılmış ve *S. Enteritidis* ile *S. Typhimurium* XLD agar (Merck 1.105287), *E. coli* ise Fluorocult VRB (FVRB) agar (Merck 1.04030) besiyerinde yayma yöntemi ile sayıları belirlenmiştir (Anonymous, 2005).

Aktif Kültürle nzenginleştirme Denemesi

Çalışmanın ilk aşamasında bakteriler, TSB'a aşılanıp 37 C'ta 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmişlerdir. Daha önceden inkübasyon sonrası tespit edilen bakteri sayılarına göre, en düşük miktarda ilave edilecek şekilde seyreltmeleri yapılıp, 25 g-mL kıyma ya da süt eklenmiş 225 mL TPS ya da LB'a aktif *S. Enteritidis* + *E. coli* ya da *S. Typhimurium* + *E. coli* olacak şekilde inoklasyonlar yapılmıştır. İnoküle edilen bakterilerin numunelere ne kadar ilave edildiği yani inokülüm sayısı *Salmonella* için XLD agar, *E. coli* ise FVRB agarda standart yöntemle belirlenmiştir. Et veya süt eklenmiş iki önzenginleştirme besiyeri 37 C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her 15; 18; 21 ve 24. saatlerde pH kontrolü yapılıp bu sürelerde *Salmonella* ve *E. coli* sayımları yapılmıştır.

Zayıflatılmış Kültürle nzenginleştirme Denemesi

Gıda materyalinden *Salmonella* geri alınması aşamasında, çeşitli önzenginleştirme besiyerleri arasındaki farklılığın belirlenmesinde, aktif bakteriye kıyasla, stres altındaki bakterinin kriter olarak alınması gerektiği ve böylelikle gerçekçi stres faktörlerinin *Salmonella* zerindeki etkisinin daha iyi anlaşılması için ortam yaratılmak istenmiştir. *Salmonella* serotiplerinin strese sokulması

amacıyla asetik asit ile muamele uygulanmıştır (Al-Nabulsi vd., 2014; Burin vd., 2014). Bu amaçla çalışmada kullanılan iki *Salmonella* serotipi, TSB'a aşılanıp 37 °C'ta 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiş, daha sonra üzerlerine asetik asit ilave edilerek ortamın pH'sı 4.0; 4.3 ve 4.5'e ayarlanarak bakterilerin strese girmesi sağlanmıştır. Bu pH'larda 0; 15; 30 ve 60. dakikalarda sayım yapılmış ve sonuçlara göre en uygun pH ve süre seçilmiştir.

Strese sokulmuş bakteriler ile yukarıda "aktif kültürle özenleştirme denemesi" bölümünde anlatıldığı şekilde devam edilmiştir.

İstatistiksel Analizler

Tüm çalışmalar 2 tekerrürlü olarak uygulanmıştır. Analiz sonuçları SAS programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca Duncan testi de uygulanmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Aktif Kültürle Özenleştirme Deneme Sonuçları

Süt ve kıyma numuneleri ile birlikte özenleştirme besiyerine düşük miktarlarda ilave edilen kültür kombinasyonlarının başlangıç sayım sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Kültürlerin başlangıç inokülüm sayıları özellikle düşük tutulmaya çalışılmıştır. Ayrıca gıda numuneleri ve kültürler ilave edilmeden önce özenleştirme besiyerlerinin başlangıç pH kontrolleri de yapılmıştır. pH kontrolü, özenleştirme besiyerindeki mikrofloranın davranışına göre değişen asitliğin takibi açısından önemlidir. Çalışma sürecinin her aşamasında kontrol edilen başlangıç pH değerleri, TPS için 7.02 ± 0.05 iken, LB'ta 6.88 ± 0.08 şeklinde olmuştur.

Özenleştirme aşamasında; toplam 24 saatlik inkübasyon sürecinde 15; 18; 21. ve 24. saatlerde pH değişimi Şekil 1a ve 1b'de verilmiştir. Kıymada TPS'de her iki serotip birbirlerine çok yakın pH değerleri vermiş ve pH 6.63 ± 0.02 - 6.74 ± 0.01 aralığında değişmiştir. Gerek serotip gerek inkübasyon süresi açısından istatistiksel açıdan

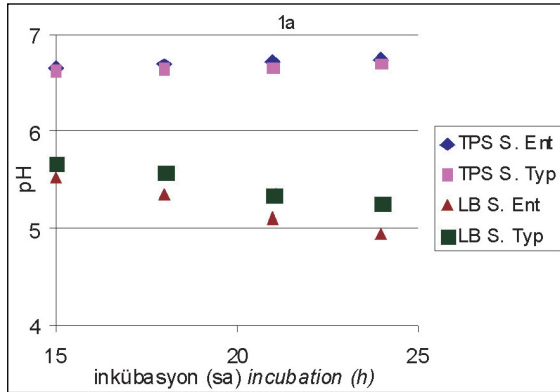
fark görülmemiştir ($P > 0.05$). LB özenleştirme ortamında pH daha düşük seyretmiş, *S. Enteritidis* serotipinde, *S. Typhimurium* serotipine kıyasla, zaman içinde pH biraz daha fazla düşmüştür. Kıyma örneğinde TPS ile LB arasında pH açısından istatistiksel açıdan önemli fark bulunmuştur ($P < 0.05$). Bu sonuç normaldir, çünkü LB besiyerinde pH'yı nötralize edebilecek/ tamponlayabilecek bir bileşen yoktur.

Aktif *Salmonella* kültürleri ile aşılanan sütte pH değişimi, kıymaya göre farklı bir seyir izlemiştir. Yine her iki *Salmonella* serotipi, TPS'de birbirlerine çok yakın pH değerleri vermişler ve gerek serotip gerek inkübasyon süresi açısından istatistiksel açıdan fark görülmemiştir ($P > 0.05$). LB besiyerinde *S. Enteritidis* olan kombinasyonda, *S. Typhimurium* olana kıyasla zaman içinde pH daha fazla düşmüştür ($P < 0.05$). Kuşkusuz, burada pH'nın daha fazla düşmesinden sorumlu olan *S. Enteritidis* değildir çünkü LB bileşiminden ve içindeki süt örneğinden asit oluşturabilecek metabolizmaya sahip değildir.

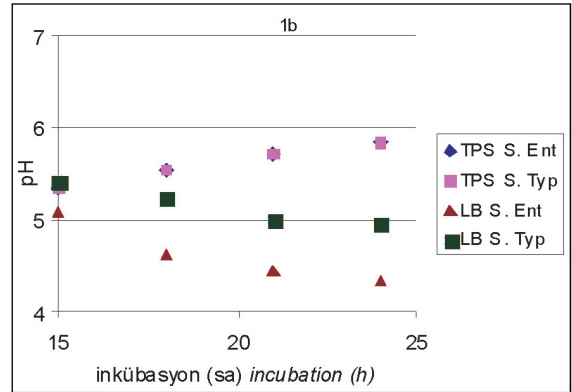
TPS bileşimi "Peptone 10.0 g/L; NaCl 5.0 g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.0 g/L; K_2HPO_4 1.5 g/L" ve LB bileşimi "Peptone 5.0 g/L; Meat (beef) extract 3.0 g/L; Lactose 5.0 g/L" şeklindedir. TPS'da gelişen bakteriler, başka bir karbon kaynağı olmaması nedeniyle gelişmeleri için gereken azot ve karbon (enerji) kaynağı olarak peptonu kullanırlar. Peptonların kullanımı ile pH'da bir miktar yükselme olur ancak fosfat tampon, pH'da bakteri gelişimini engelleyecek değişime izin vermez. LB'ta tampon görevini üstlenecek bileşenler yoktur ve ayrıca alternatif karbon kaynağı olarak laktöz vardır. *Salmonella* gibi laktozu karbon kaynağı olarak kullanamayan bakteriler, azot ve karbon gereksinimlerini, besiyeri bileşimindeki pepton ve et özütünden karşılarlar. Besi ortamında sadece *Salmonella* gibi laktoz negatif bakteriler varsa pH'da yükselme olması beklenir. *E. coli*, laktoz pozitif ve karbon kaynağı olarak laktozu kullanır. Laktozun metabolize edilmesi sonunda asidik ürünler ortaya çıkar. *E. coli*, azot gereksinimini karşılamak için pepton ve/ veya et özütünü kullanmak zorundadır. Bu sırada pH bir miktar yükselir ancak oluşan asitler, bazik ürünlerden

Çizelge 1. Özenleştirme besiyerlerine eklenen aktif kültürlerin gıda örneklerine göre başlangıç sayıları (log KOB/250 mL)
Table 1. Initial culture counts (log CFU/250 mL) of active cultures added to pre-enrichment media for different food samples

Gıda Numuneleri Food samples	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>
UHT Süt UHT milk	2.39±0.29	2.49±0.43	2.16±0.15
Kıyma Minced meat	1.82±0.12	1.66±0.31	1.88±0.19



Şekil 1a. Aktif kültürde kıymada pH değişimi
TPS: Tamponlanmış peptonlu su; LB: Laktoz broth
Figure 1a. pH change in minced meat with active culture.
TPS: Buffered peptone water; LB: Lactose broth



Şekil 1b. Aktif kültürde sütte pH değişimi
TPS: Tamponlanmış peptonlu su; LB: Laktoz broth
Figure 1b. pH change in milk with active culture.
TPS: Buffered peptone water; LB: Lactose broth

daha fazla olduğu için pH'da inkübasyon süresi içinde gözle görülür bir azalma olur. Buna bağlı olarak LB'ta süt örneği ile çalışılırken, *S. Enteritidis* olan kombinasyonda pH'nın daha düşük olarak ölçülmesinin nedeni, *S. Typhimurium* olan kombinasyonda bu serotipin peptonların parçalanma ürünlerini daha fazla oluşturarak pH'yı diğer serotipe kıyasla daha fazla yükselttiği düşünülebilir (Barrow ve Feltham, 2004; Tunail, 2009; Dwivedi vd., 2014; Ray ve Bhunia, 2016).

Yapılan bir rekabet çalışmasında *Lactobacillus crispatus* ve *Clostridium lactatifermentans* karışık ve tek kültürlerinin, yapay etlik piliç bağırsak ortamında *S. Enteritidis* serotipi üzerinde inhibisyon etkisi 5.8 ve 7.0 pH'larda araştırılmış ve sonuçta inhibisyonunda görülen fark, laktozdan oluşan laktat, asetat ve propiyonat ile ilişkilendirilmiştir (Wielen vd., 2002).

Bir başka çalışmada ise (Kang vd., 2015), *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* ve *Listeria monocytogenes* inaktivasyonunda pH ve ohmik ısıtmanın etkisi araştırılmış ve pH'nın etkisi gösterilmiştir.

Çizelge 2'de kıyma ve süte aktif halde inoküle edilen *Salmonella* serotiplerinin özenleştirme besiyerlerinde inkübasyon süresi boyunca gelişimi verilmiştir.

E. coli, gerek kıyma gerek süt örneğinde, TPS ve LB ortamlarında ve her iki serotipin varlığından etkilenmeden standart gelişimini sürdürmüştür ve yaklaşık olarak 8 - 9 log KOB/mL sayım sonucu vermiştir ($P > 0.05$). Özellikle süt örneğinde LB ortamındaki inkübasyonda düşen pH'ya rağmen gelişmesini kolaylıkla sürdürebilmesi, *E. coli*'nin *Salmonella* serotiplerine kıyasla aside daha dirençli olması ile açıklanabilir.

Çizelge 2. Aktif *Salmonella* serotiplerinin iki farklı özenleştirme besiyerinde gelişimi (log KOB/mL)
Table 2. Growth of active *Salmonella* serotypes in two different pre-enrichment media (log CFU/mL)

Gıda Food	İnkübasyon (sa) Incubation (h)	<i>S. Enteritidis</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
		TPS	LB	TPS	LB
Süt Milk	15	8.08±0.18 ^{aA}	7.52±0.38 ^{aA}	8.09±0.01 ^{aB}	7.50±0.15 ^{aA}
	18	8.19±0.19 ^{aA}	7.35±0.45 ^{aA}	8.12±0.11 ^{aAB}	7.44±0.50 ^{aA}
	21	8.20±0.09 ^{aA}	6.68±1.08 ^{aA}	8.23±0.01 ^{aAB}	6.41±1.53 ^{aA}
	24	8.20±0.06 ^{aA}	6.40±1.50 ^{aA}	8.36±0.10 ^{aA}	5.31±2.06 ^{aA}
Kıyma Minced meat	15	7.92±0.18 ^{aA}	7.68±0.28 ^{aA}	8.20±0.12 ^{aA}	7.79±0.14 ^{aAB}
	18	8.03±0.01 ^{aA}	7.12±0.17 ^{aA}	8.27±0.07 ^{aA}	7.99±0.04 ^{aA}
	21	8.14±0.22 ^{aA}	7.42±0.02 ^{aA}	8.30±0.08 ^{aA}	7.96±0.02 ^{aA}
	24	8.15±0.25 ^{aA}	6.80±0.50 ^{aA}	8.38±0.08 ^{aA}	7.59±0.02 ^{aB}

^{aB} Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$)

^{AB} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$)

^{ab} The values shown in different letters within a line are significantly different ($P < 0.05$)

^{AB} The values shown in different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$)

TPS: Buffered peptone water; LB: Lactose broth

Zayıflatılmış Kültür İnoküle Edilmiş Özenleştirme Besiyerinden *Salmonella* Geri Alınma Sonuçları

Analizlerin ikinci aşamasında, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* serotiplerinin zayıflatılması amacıyla asetik asit ile daha önceden belirlenen pH ve süre kombinasyonu ile muamele edilmiştir (Çizelge 3). Yapılan denemeler sonucunda en uygun pH olarak 4.3 ve süre olarak 60 dk olarak belirlenmiş ve *Salmonella* serotipleri bulunan bu sonuçlar doğrultusunda asetik aside maruz bırakılmıştır (Yuk vd., 2014; Kang vd., 2015). Bu aşamada *E. coli* için herhangi bir zayıflatma işlemi uygulanmamıştır. Amaç *Salmonella* için *E. coli* varlığında gıda içerisinde doğal bir ortam yaratılmak istenmesidir.

Çizelge 3. *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'un pH 4.3'te asetik asit uygulama sonrası belirlenen sürelerde alınan sayım sonuçları (log KOB/mL)

Table 3. Enumeration results of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* after treatment with acetic acid at pH 4.3 (log CFU/mL)

Uygulama süresi (dk) Treatment time (minute)	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
0	8.04±0.29	8.06±0.72
15	7.11±0.11	7.30±0.62
30	6.03±0.06	6.27±0.65
60	4.95±0.10	5.05±0.16

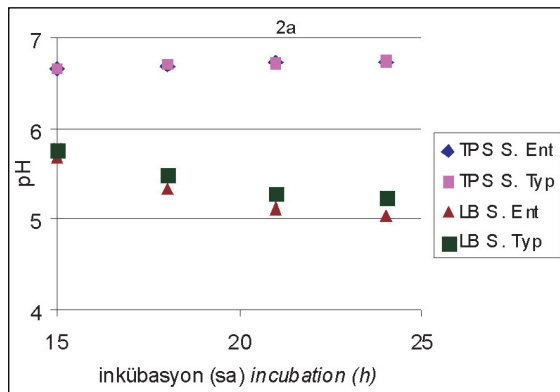
TPS ve LB'a inoküle edilen kültür kombinasyonlarının başlangıç sayım sonuçları *E. coli* için 3.3±0.19; *S. Typhimurium* için 2.38±0.12 ve *S. Enteritidis* için 2.51±0.2 log KOB /250 mL-g şeklindedir.

Çalışmanın devamı, ilk aşamadaki gibi sürdürülmüştür. Zayıflatılmış *Salmonella* serotiplerinin bir koliform grup bakteri olan aktif *E. coli* suşu ile

farklı özenleştirme besiyerlerinde birbiri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Özenleştirme aşamasında; 24 saatlik inkübasyon sürecinde 15; 18; 21 ve 24. saatlerde pH değişimi şekil 2a ve 2b'de verilmiştir.

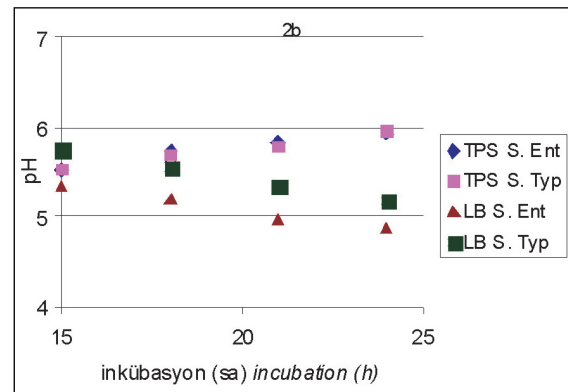
pH değişimi açısından zayıflatılmış *Salmonella* serotipleri ile yapılan deneme de, aktif kültürler ile yapılan deneme sonuçlarına kısmen benzemektedir çünkü LB ortamında da pH düşüşünden sorumlu olan bakteri *E. coli* olup, bu bakteriye herhangi bir zayıflatma işlemi uygulanmamıştır. LB'ta pH azalması TPS'ye göre istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$). Ancak, bu uygulamada *Salmonella* serotipleri arasında aktif kültürdekinden farklı olarak pH değişiminde fark görülmemiş, her 2 serotipin varlığında ve her 2 gıda örneğinde pH aynı şekilde düşmüştür ($P > 0.05$). Bu sonuç, aktif kültürde *S. Typhimurium*'un daha fazla metabolik aktivite göstererek pH'yı yükselttiği şeklindeki yorumu desteklemektedir. Bir diğer deyiş ile zayıflatılma uygulaması özellikle *S. Typhimurium* için daha etkili olmuş ve pH'yı yükseltebilecek yeterli metabolik aktivite gösterememiştir.

Çizelge 4'te 15; 18; 21 ve 24. saat inkübasyon sürelerinde zayıflatılmış *Salmonella* serotiplerinin sayısındaki değişim verilmiştir. Aktif kültürle yapılan denemede olduğu gibi *S. Enteritidis* serotipi her 2 gıda örneği ve özenleştirme ortamından etkilenmemiş ($P > 0.05$), ancak *S. Typhimurium* LB'ta daha düşük sayılar vermiştir ($P < 0.05$). *E. coli* ise, gıda örneği, özenleştirme besiyeri ve *Salmonella* serotipinden etkilenmeyip yine çok yaklaşık olarak 8-9 log CFU/g-mL sayım sonucu vermiştir ($P > 0.05$).



Şekil 2a. Zayıflatılmış kültürde kıymada pH değişimi; TPS: Tamponlanmış peptonlu su; LB: Laktöz broth

Figure 2a. pH change in minced meat with passive (injured) culture. TPS: Buffered peptone water; LB: Lactose broth



Şekil 2b. Zayıflatılmış kültürde sütte pH değişimi; TPS: Tamponlanmış peptonlu su; LB: Laktöz broth

Figure 2b. pH change in UHT milk with passive (injured) culture. TPS: Buffered peptone water; LB: Lactose broth

Çizelge 4. Zayıflatılmış *Salmonella* serotiplerinin iki farklı önzenginleştirme besiyerinde gelişimi (log KOB/mL)
Table 4. Growth of passive (injured) *Salmonella* serotypes in two different pre-enrichment media (log CFU/mL)

Gıda Food	İnkübasyon (sa) Incubation (h)	S. Enteritidis		S. Typhimurium	
		TPS	LB	TPS	LB
Süt Milk	15	8.03±0.18 ^{ab}	7.77±0.16 ^{ab}	6.36±0.16 ^{ab}	4.44±0.08 ^{ab}
	18	7.99±0.18 ^{ab}	7.45±0.44 ^{ab}	6.62±0.28 ^{ab}	4.71±0.14 ^{ba}
	21	8.11±0.13 ^{ab}	6.10±1.22 ^{ab}	6.56±0.22 ^{ab}	3.65±0.35 ^{ba}
	24	8.03±0.08 ^{ab}	6.41±1.16 ^{ab}	7.02±0.09 ^{ab}	4.10±0.12 ^{ba}
Kıyma Minced meat	15	8.19±0.01 ^{ab}	7.50±0.42 ^{ab}	4.60±0.08 ^{ab}	3.96±1.06 ^{ab}
	18	8.11±0.06 ^{ab}	7.45±0.63 ^{ab}	4.93±0.62 ^{ab}	4.02±1.42 ^{ab}
	21	8.14±0.11 ^{ab}	7.40±0.43 ^{ab}	5.20±0.16 ^{ab}	4.85±2.25 ^{ab}
	24	8.05±0.05 ^{ab}	7.25±0.32 ^{ab}	5.70±0.20 ^{ab}	4.37±1.57 ^{ab}

^{ab} Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$)

^{AB} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$)

^{ab} The values in different letters within a line are significantly different ($P < 0.05$)

^{AB} The values in different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$)

TPS: Buffered peptone water; LB: Lactose broth

Ramrani vd. (2010), baharat içeren yüksek asitli gıdalarda *S. Typhimurium* serotipinin geri alınması üzerine yaptıkları bir çalışmada 3 log KOB/ 250 mL ve daha az sayıda bakteri varlığında, bazı durumlarda geri alamama sorununu, çift kuvvetli TPS kullanarak asitliğin daha iyi nötralize edildiğini ve bu şekilde sorunun çözüldüğünü bildirmişlerdir. *Salmonella* analizinde özellikle asit karakterli gıda örnekleri ile çalışıldığında, çift kuvvetli önzenginleştirme besiyeri kullanılması Dwivedi vd. (2014) tarafından da önerilmektedir.

SONUÇ

Salmonella, bilinen en tehlikeli gıda kaynaklı patojenlerden biri olmasına rağmen, gıdalarda refakatçi flora olarak bulunan başta *E. coli* olmak üzere, diğer bakterilere kıyasla fizyolojik karakterler bakımından daha zayıftır. Asitlik, çeşitli kimyasallar, düşük sıcaklık vb. olumsuz koşullardan önemli ölçüde etkilenir. Hasar görme (stres) derecesine bağlı olarak, selektif katı besiyerlerinde gelişip koloni oluşturamayabilir. Bu gibi mikroorganizmalar "canlı ancak kültüre alınamayan (Viable but non-culturable; VBNC) olarak tanımlanırlar. *Salmonella*, dışkı kökenli enterik bir bakteri olduğu için, *Salmonella* bulaşmış gıdalarda aynı çevresel kökenden gelen, başta koliform grup bakteriler olmak üzere, çok sayıda tür ve miktarda refakatçi flora bulunur.

Bu çalışmada, iki önemli uluslararası kuruluş tarafından önerilen, önzenginleştirme besiyerleri karşılaştırılmış ve inkübasyon sürecinde, çeşitli inkübasyon sürelerinde mikroorganizma gelişimi

izlenerek, pH ile birlikte sayıdaki değişim gözlemlenmiştir. Serotip farkının da önemli olup olmadığının araştırılması için, 2 farklı *Salmonella* serotipi denenmiştir. Analizler sonucunda, UHT süt ve kıyma örnekleri için önzenginleştirme aşamasında belirlenen inkübasyon sürelerinde yapılan analizler sonucunda, *S. Enteritidis* serotipinin aktif ve zayıflatılmış olması, önzenginleştirme besiyerlerindeki farklılık, mikroorganizma sayısında istatistiksel olarak fark oluşturmamıştır ($P > 0.05$). Ancak zayıflatılmış *S. Typhimurium* serotipinde LB'taki sayı TPS'dan daha düşüktür ($P < 0.05$)

Her 2 gıda örneğinde de inkübasyon süresince pH, TPS'da stabil kalmış ancak beklenildiği gibi LB'ta düşmüştür. Bununla beraber, pH'daki azalma, *Salmonella* serotiplerinin tümüyle yok olmasına yetecek düzeyde olmamıştır.

Sonuç olarak; denemelerde kullanılmış olan aktif ve zayıflatılmış *Salmonella* suşları, önzenginleştirme amacıyla kullanılan LB ve TPS besiyerleri, kıyma ve süt örnekleri arasında kimi koşullarda fark bulunmuşsa da, her koşulda selektif besiyerinde *Salmonella* sayım sonucu alınmıştır.

Teşekkür: Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 15H0443008 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Ahmed, O.B., Asghar, A.H., Abd El-Rahim, I.H., Hegazy, A.I. (2014) Detection of *Salmonella* in food samples by culture and polymerase chain reaction methods. *J Bacteriol Parasito*, 5:187. doi: 10.4172/2155-9597.1000187.

- Ahn, D.U., Kim, I.S., Lee, E.J. (2013). Irradiation and additive combinations on the pathogen reduction and quality of poultry meat. *Poult Sci*, 92:534-545. doi: 10.3382/ps.2012-02722.
- Al-Nabulsi A.A., Olaimat A.N., Osaili T.M., Shaker R.R., Elabedeen N.Z., Jaradat Z.W., Abushelaibi A., Holley R.A. (2014). Use of acetic and citric acids to control *Salmonella* Typhimurium in tahini (sesame paste). *Food Microbiol*, 42:102-108. doi: 10.1016/j.fm.2014.02.020.
- Anonymous (2002). Microbiology of the Food Chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Draft International Standard ISO/DIS 6579. International Organization for Standardization ISO. Switzerland, 48 s.
- Anonymous (2005). Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A.K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 358 s. ISBN : 975-00373-0-8.
- Anonymous (2010). Gıda ve Hayvan Yemleri - *Salmonella*. Türk Standartları Enstitüsü TS EN ISO 6579/A1. Ankara, 7 s.
- Anonymous (2016a). Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* -- Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique. ISO/TS 6579-2:2012. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=56713. (Accessed: 18 September 2016).
- Anonymous (2016b). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5 *Salmonella*. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> (Accessed: 20 August 2016).
- Anonymous (2017). Commission regulation (EU) No 1086/2011 <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02011R1086-20111117> (Accessed: 20 February 2017).
- Aytaç, S.A., Taban, B.M. (2010). Gıda kaynaklı intoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi. Ed O. Erkmen. Eflatun Basım Dağıtım Yayıncılık Ltd., Ankara, 552 s. ISBN: 978-605-4334-02-5.
- Barrow, G.L., Feltham, R.K.A. (Eds) (2004). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd Edition. Cambridge University Press, U. K., 352pp. ISBN: 9780521543286.
- Burin, R.C.K., Silva Jr., A., Nero, L.A. (2014). Influence of lactic acid and acetic acid on *Salmonella* spp. growth and expression of acid tolerance-related genes. *Food Res Int*, October:726-732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.019>.
- Daquigan, N., Grim, C.J., White, J.R., Darcy, E., Hanes, D.E., Karen G., Jarvis K.G. (2016). Early recovery of *Salmonella* from food using a 6-hour non-selective pre-enrichment and reformulation of tetrathionate broth. *Front Microbiol*, December doi: 10.3389/fmicb.2016.02103.
- D'aust, J.Y. (1997). *Salmonella* species. Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. Eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville. American Society for Microbiology, Washington, USA, 768 pp.
- Dwivedi, H.P., Mills, J.C., Devulder, G. (2014). Enrichment. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson, R. (chief Ed.) 2nd Edition. Vol 2. Elsevier Ltd, Oxford, UK. pp 637-643. ISBN: 9780123847331.
- Doğan, H.B. (1993). Gıda maddelerinde *Salmonella* aranması üzerinde karşılaştırmalı bir araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 93 s.
- Doğan, H.B., Halkman, A.K., Rahati Noveir, M. (1994). Gıdalarda hızlı *Salmonella* Kontrolü Üzerine Bir Araştırma. *GIDA*, 19(5):305-311.
- Erol, İ. (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. 1. Baskı. Pozitif Matbaacılık. Ankara, 392s. ISBN: 978-975-00131-0-9.
- Halkman, A.K. (2013). Gıda Mikrobiyolojisi II Ders Notları. Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Basılmamış.
- Halkman, A.K., Doğan, H.B., Rahati Noveir, M. (1994). Gıda maddelerinde *Salmonella* ile *E. coli* arama ve sayılma yöntemlerinin karşılaştırılması. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 21, Armoni Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 93s.
- Holbrook, R., Anderson, J.M., Baird-Parker, A.C., Doos, L.M. (1989). Rapid detection of *Salmonella* in foods - A convenient two day procedure. *Lett Appl Micr*, 8:139-142. doi: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00259.x.
- Hoorfar, J., Baggesen, D.L. (1998). Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp. from swine and poultry. *FEMS Microbiol Lett*, 169(1):125-130. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13308.x

- Ibrahim, G.F. (1986). A review of immunoassays and their application to *Salmonellae* detection in foods. *J. Food Prot*, 49(4):299-310.
- Jean-Gilles Beaubrun, J., Flamer, M.L., Addy, N., Ewing, L., Gopinath, G., Jarvis, K., Grim, C., Hanes, D.E. (2016). Evaluation of corn oil as an additive in the pre-enrichment step to increase recovery of *Salmonella* Enterica from oregano. *Food Microbiol*, 57:195-203. doi: 10.1016/j.fm.2016.03.005.
- Juneja, V.K., Valenzuela-Melendres, M., Heperkan, D., Bautista, D., Anderson, D., Hwang, C., Peña-Ramos, A., Camou J.P., Torrentera-Olivera, N. (2016). Development of a predictive model for *salmonella* spp. reduction in meat jerky product with temperature, potassium sorbate, ph, and water activity as controlling factors. *Int J Food Microbiol*, 236:1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.028.
- Kang, D-H., Lee, J-Y., Kim, S-S. (2015). Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. *LWT - Food Sci Techno*, 62, June:83-88. doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.020.
- Lee, K-Y., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276. doi: 0.1016/j.foodcont.2014.07.011.
- Liandris, E., Gazouli, M., Taka, S., Andreadou, M., Vaiopoulou, A., Tzimotoudis, N., Kasampalidis, I., Mpaseas, D., Fyliousis, G., Poltronieri, P., Cook, N., Ikonomopoulos, J. (2014). Evaluation of the microbial safety of child food of animal origin in Greece. *J Food Sci*, 79(3):M362-368. doi: 10.1111/1750-3841.12366.
- Mercanoglu, B., Griffiths, M.W. (2005). Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of *Salmonella* in milk, ground beef and alfalfa sprouts. *J. Food Prot*, 68(3): 557-561. doi: 10.4315/0362-028X-68.3.557
- Montville, T.J., Mathews, K.R. (2007). Growth, survival and deaths of microbes in foods. In "Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers 3rd Ed. Edited by M.P. Doyle and L.R. Beuchat" ASM Pres. Washington D.C.
- Myint, M.S., Johnson Y.J., Tablante N.L., Heckert R.A. (2006). The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol*, 23(6):599-604. doi: 10.1016/j.fm.2005.09.002.
- Pignato, S., Marino, A.M., Emanuele, M.C., Iannotta, V., Caracappa, S., Giammanco, G. (1995). Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonellae* in foods. *Appl Environ Microbiol*, 61(5):1996-1999.
- Poltronieri, P., Cimaglia, F., De Lorenzis, E., Chiesa, N., Mezzolla, V., Reca, I.B. (2016). Protein chips for detection of *Salmonella* spp. from enrichment culture. *Sensors (Basel)*. 16(4):574 doi: 10.3390/s16040574.
- Ramnani, P., Jarvis, B., Mackey, B. (2010). Comparison between pre-enrichment in single- or double-strength buffered peptone water for recovery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 from acidic marinade sauces containing spices. *Food Control*, 21: 1303-1306. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.03.005.
- Rathnayaka, R.M.U.S.K. (2011). Effect of sample pre-enrichment and characters of food samples on the examination for the *Salmonella* by plate count method and fluorescent in-situ hybridization technique. *Am Food Techno*, 6:851-856. doi: 10.3923/ajft.2011.851.856.
- Ray, B., Bhunia, A. (2016). Temel Gıda Mikrobiyolojisi. 5. basımdan çeviri. Çeviri Editörü Heperkan, D. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd., Ankara, Türkiye, 608 s. ISBN 978-605-320-543-2.
- Telli, R. (2006). Afyon'da tüketime sunulan tavuk karkas ve tavuk eti örneklerinde *Salmonella* spp. varlığının klasik kültür tekniği ile saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı.
- Timme, R.E., Allard, M.W., Luo, Y., Strain, E., Pettengill, J., Wang, C., Li, C., Keys, C.E., Zheng, J., Stones, R., Wilson, M.R., Musser, S.M., Brown, E.W. (2012). Draft genome sequences of 21 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains. *J Bacteriol*, 194:5994-5995. doi: 10.1128/JB.01289-12.

- Torlak, E. (2011). Gıda mikrobiyolojisinde *Enterobacteriaceae* üyeleri için kromojenik ve florojenik besiyerleri. *Türk Hij ve Den Biyol Derg*, 68(1):49-58.
- Torlak, E., Sert, D., Serin, P. (2013). Fate of *Salmonella* during sesame seeds roasting and storage of tahini. *Int J Food Microbiol*, 163:214-217. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.010.
- Trampel, D.W., Holder, T.G. Gast, R.K. (2014). Integrated farm management to prevent *Salmonella enteritidis* contamination of eggs. *J Appl Poult Res*, 23(2):353-365. doi: 10.3382/japr.2014-00944.
- Tsai, H.S.C., Slavik, M.F. (1991). Rapid method for detection of *Salmonellae* attached to chicken skin. *J Food Saf*, 11:205-214.
- Tunail, N. (2009). *Mikrobiyoloji*. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 434 s. ISBN: 978-605-603-62-0-0.
- Var, I., Evliya, B. (1995). Çeşitli yumurtalarda *Salmonella* taraması. *GIDA*, 20(6):387-391.
- Vazgeçer, B., Temiz, A. (2005). *Salmonella* izolasyonu ve tanımlanması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(4):1-27. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050401.pdf.
- Van der Wielene, P.W.J.J., Lipman, L.J.A., van Knapen, F., Biesterveld, S. (2002). Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. *Appl Environ Microbiol*, 68(2):555-559. doi: 10.1128/AEM.68.2.555-559.2002.
- Yuk, H-G., Yang, Y., Kadim, M.I., Khoo, W.J., Zheng, Q, Setyawati, M.I., Shin, Y-J., Lee, S-C. (2014). Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella* Enteritidis cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. *Int J Food Microbiol*, 191:24-31. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.034.
- Zorba, N.N. (2010). Gıda Kaynaklı Enfeksiyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi. Ed O. Erkmén. Eflatun Basım Dağıtım Yayıncılık Ltd., Ankara, Türkiye, 552 s. ISBN: 978-605-4334-02-5.