



YEŞİL YAPRAKLILARIN SALMONELLA KONTAMİNASYONUNDA TERE MODELİ

Sahin Namli*, Yeşim SOYER

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, Ankara, Türkiye, 06800



Özet

Son yıllarda taze tüketilebilen yeşil yapraklı bitkisel gıdalardan kaynaklı gıda salgınlarının sayısı artmıştır. Salgınların artma sebeplerinden birisi de insanların beslenme alışkanlıklarında taze ve az işlenmiş gıdaların tüketimine yönelmeleridir. Taze olarak tüketildiğinde besin değerindeki yüksek kazanımın yanında, bu tarz gıdaların tarla seviyesinde patojenlerle kontamine olmaları sonucunda taze tüketimi hastalık riski de oluşturabilmektedir. Gıdalarda hastalık yapıcı etkenlerin biri de bakterilerdir. Bakterilerin, biyofilm adı verilen, tutundukları yüzeyden zor temizlenebilen ve bakterilerin canlılık faaliyetlerini devam ettirebildikleri yapılar oluşturdukları bilinmektedir. Zaman içerisinde tavuk ve tavuk ürünlerinde sıkça rastlanan, salgınlara sebep olan *Salmonella* bakterisi, son yıllarda taze tüketilen bitkisel gıdalarda da yoğun salgınlara neden olmaktadır. Bu çalışmada *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Newport serotipinin model yeşil yapraklı bitkisel gıda üzerinde yaşama, üreme ve tutunma özellikleri incelenmiştir. Model bitki olarak bahçe teresi (*Lepidium sativum* Linn) kullanılmıştır. Optimum büyüme koşullarında iklim kabini içerisinde gün döngüsü ile geliştirilen tere örnekleri tohumdan başlayarak farklı aşamalarda kontamine edilmiştir. Otuz gün sonunda hasat edilen örneklerde *Salmonella* sayımı ve SEM ile yaprak görüntülemesi yapılmıştır. Sonuçlar göstermektedir ki, tohumdan kontamine edilen örnekler hasatta *Salmonella* taşımaktadır. Dört farklı haftada sulama ile kontamine edilen örneklerde de hasat zamanında *Salmonella* tespit edilmiştir. Elektron mikroskobu incelemesi, bakterilerin yüzeyde biyofilm yapıları oluşturarak hasada kadar yaşamlarını sürdürdüklerini göstermiştir.

Giriş

Salmonella, gram-negatif çubuk şekilli, fakültatif anaerobik bakteri cinsidir. Zoonotik bir patojen olan *S. enterica*, insanlarda Salmonelloz adlı hastalığa neden olur. Bu hastalık, AB'de en sık bildirilen zoonozlar listesinde ikinci sırada yer almaktadır (EFSA ve ECDC, 2019). DSÖ tarafından gerçekleştirilen büyük ölçekli bir çalışmada, her yıl 93,8 milyon gastroenterit vakası ve 155.000 ölümün tifoid olmayan *Salmonella* enfeksiyonundan kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Majowicz ve ark., 2010). Değişen yeme alışkanlıkları ile dünya genelinde yeşil yapraklı sebzelere artan bir talep bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu yeşil yapraklı sebzelerle hazırlanan salatalar, toprak, sulama suyu, yaban hayatı, uygunsuz organik gübre kullanımı veya insan kullanımı, nakliye ve ekipman gibi diğer kaynaklarla kirlenebileceğinden, küresel olarak gıda kaynaklı salgınların yaygın kaynaklarıdır. Kapsamlı verilere göre gıda kaynaklı salgınların önemli bir kısmı taze tüketilen meyve ve sebzelere atfedilmiştir (Brandl, 2006). Gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan birçok patojen türü olmasına rağmen, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes*, yeşil yapraklı sebzeler aracılığıyla gıda kaynaklı salgınlara neden olabilecek en yaygın patojenlerdir (Mercanoğlu Taban ve Halkman, 2011; Chitarra ve ark., 2014). Yeşil yapraklı sebzelerle ilgili salgınlar ve bunların şiddetli sonuçları, taze tüketilen sebzelerde gıda kaynaklı patojenlerin varlığının hem tüketiciler hem de ekonomi için artan bir risk oluşturduğunu göstermiştir.

Amaç

Bu çalışmada yeşil yapraklı taze tüketilen bitkisel gıdalarda tohumdan itibaren farklı zaman dilimlerinde meydana gelen *Salmonella* bulaşının hasat zamanında hala tespit edilebilir olup olmadığı ve meydana gelen bulaşındaki hücrelerin yaprak yüzeyindeki tutunmaları hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşu

Çalışmada MET S1-166 kod numarası ile ODTÜ Gıda Mühendisliği izolat bankasında yer alan *Salmonella* Newport (*S. Newport*) susu kullanılmıştır.

Tere Üretimi

Bahçe teresi tohumları, ekimden önce %12'lik çamaşır suyu çözeltisine 12 dakika süresince daldırılıp ardından 3 defa arınık su ile yıkanarak yüzeylerinin sterilizasyonu sağlanmıştır. Steril ticari torf içeren her bir saksıya bir gram tohum ekilmiş ve ekimden başlayarak saksılar haftada üç kez 60 mL steril distile su ile sulanmıştır. Terelerin yetiştirilmesi sıcaklık, gündüz-gece döngüsü ve bağıl nem ayarlarına sahip bir iklim kabininde gerçekleştirilmiştir. Çimlenme sırasında, optimum çimlenme koşullarını sağlamak için saksılar, "tohum kontaminasyonu" deneyi dışında 20°C'de bir hafta bekletilmiştir. Daha sonra, ekimden sonraki 30. gün olan hasat zamanına kadar büyümeyi tamamlamak için iklim odasının sıcaklığı 15°C'ye ayarlanmıştır. Bağıl nem %65'e ayarlanmış, 16 saat aydınlık (8000 lüks) ve 8 saat karanlıkta bir günlük döngü gerçekleştirilmiştir. Tohum kontaminasyonu testi için ise, tüm yetiştirme süresi boyunca sıcaklık 15°C'de tutulmuştur.

Tohum Kontaminasyonu

Tohum kontaminasyonu, ekim sırasında tohumların 1 dakika boyunca log 8 (EMS/mL) *S. Newport* içeren sıvı besiyeri içerisinde daldırılması ile gerçekleştirilmiştir.

Sulama İle Kontaminasyon

Sulama suyu kontaminasyonu, log 8 (EMS/mL) *S. Newport* içeren 60 mL sıvı besiyeri bitkilerin üzerine püskürtülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kontamine sulamalar dışında tüm saksı grupları haftalık sulama programına göre 60 mL steril arınık su ile sulanmıştır (Tablo 1).

Salmonella Tespiti ve Sayımı

Salmonella tespit ve sayımı için ISO 6579-1:2017 (ISO, 2017) ve (ISO/TS 6579-2:2012) (ISO,2012) standart yöntemleri kullanılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM ile inceleme yapmak için yaprak örnekleri metanol ile sabitlendikten sonra sıralı alkol çözeltileri ve aseton ile kurutulmuş sonrasında ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği'nden hizmet alımı şeklinde incelemeye tabi tutulmuştur.

Tablo 1. Sulama Programı

		Saksı Grup Kodları				
		0	1	2	3	4
Çimlenme	0. Gün	Kontamine Ekim	Steril Ekim	Steril Ekim	Steril Ekim	Steril Ekim
	3. ve 5. Gün	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama
%65 Bağıl Nem	7. Gün	Steril Sulama	Kontamine Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama
	10. ve 12. Gün	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama
Gelişme	14. Gün	Steril Sulama	Steril Sulama	Kontamine Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama
	17. ve 19. Gün	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama
%65 Bağıl Nem	21. Gün	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Kontamine Sulama	Steril Sulama
	24. ve 26. Gün	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama
	28. Gün	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Steril Sulama	Kontamine Sulama
	30. Gün	Hasat	Hasat	Hasat	Hasat	Hasat

Bulgular ve Tartışma

Tohum Kontaminasyonu

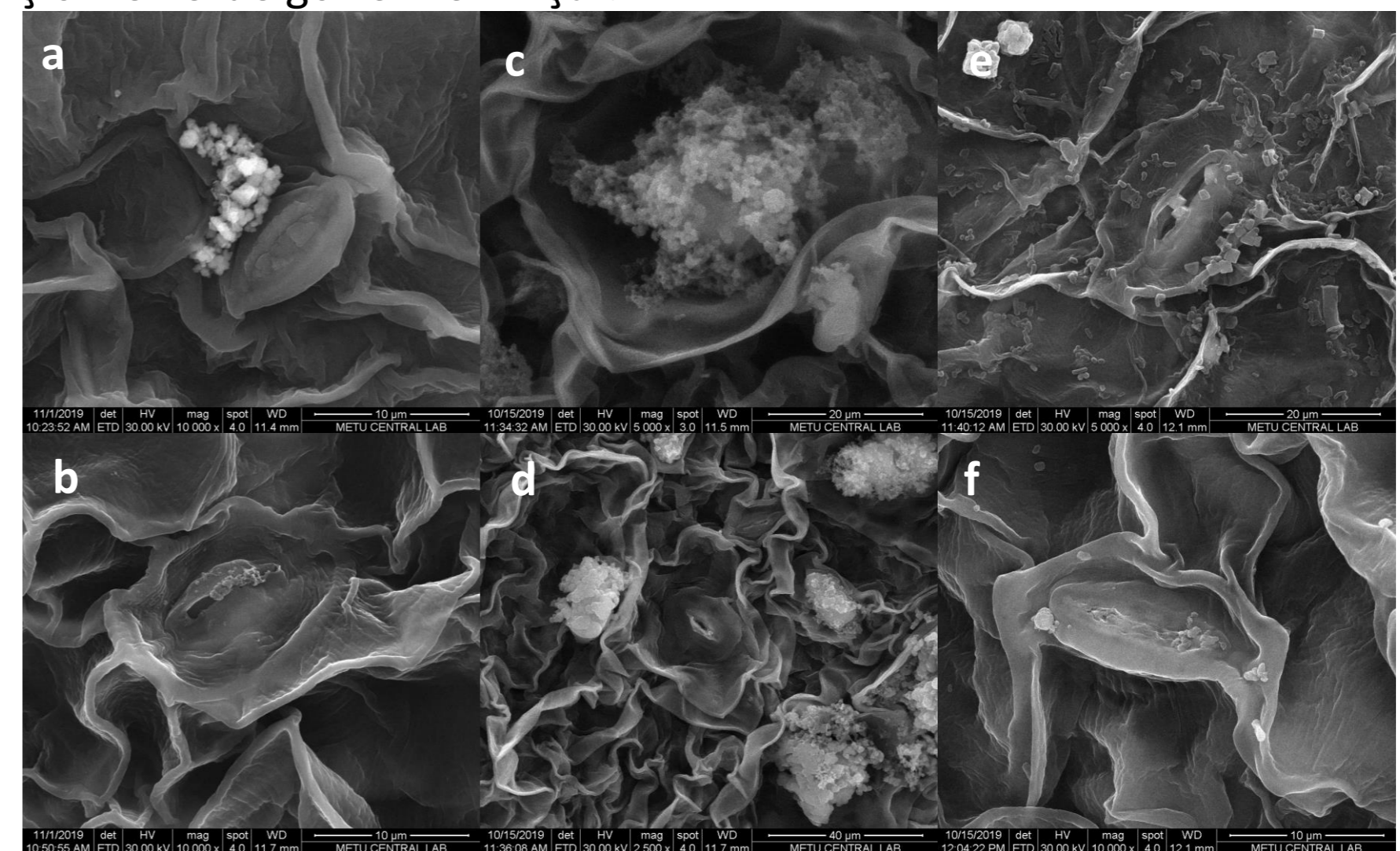
Tohumlar kontamine edildiğinde toplam bulaş miktarını ölçmek için *Salmonella* sayımı yapılmış ve tohumlardaki başlangıç bulaş miktarı 6.8 log(EMS/gram) olarak tespit edilmiştir. 'Tohum Kontaminasyonu' grubu üç adet paralel saksıdan oluşmaktadır. Sonuçlar göstermektedir ki tohumdan kontaminasyon grubu için hasatta elde edilen tüm paraleller ürünlerde *Salmonella* tespit edilmiştir. *Salmonella* sayım sonuçları üç saksı için ortalama olarak 5.22 log(EMS/gram) olarak bulunmuştur. Sonuçlarda görüldüğü üzere tohumun kontaminasyonu, bitkinin geliştirilmesi sonunda tohumdan tere yapraklarına bakteri geçişiyle sonuçlanmıştır. Tohumların başlangıçtaki mikrobiyal yükünün de ~ 1.6 log azaldığı tespit edilmiştir.

Sulama İle Kontaminasyon

Sulama ile kontaminasyon, bakteri solüsyonunun tere üzerine püskürtülmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Terenin yetiştirilmesi süreci içinde farklı bulaşma zamanlarını temsil eden dört grup yer almaktadır. Bu dört gruba, ilk haftadan hasada kadar her hafta sonunda kontamine sulama uygulanmıştır. Bu dört gruba ait her 3 paralelin hasat sonunda *Salmonella* içerdiği tespit edilmiştir. İlk haftanın sonundan itibaren, terenin kontaminasyonunun, bu patojenle bulaşmış ürünlerle sonuçlandığını gösterilmiştir. Bu sonuçlar, hasat öncesi adımlarda bile bitkinin kontamine olmasının önemini göstermektedir.

Taramalı Elektron Mikroskobu

Her bir gruba ait paralel üç saksıdan yetişen ürünlerden birer adet merkezde yer alan geniş yüzeyli yaprak SEM ile incelenmek için seçilmiş ve gözlemlenmiştir. Tohumdan kontamine ve sulama ile kontamine örneklerin tümünde biyofilm benzeri yüzeye tutunmuş yapılar tespit edilmiştir (Şekil 1). Bu tarz yapıların yaprak kıvrımlarında ve yaprak çukurları (stoma dahil) çokça yerleştiği görülmüştür. Bu yapıların yoğunluğu 1. hafta kontamine edilen örneklerde az olmakla beraber en çok 3. hafta kontamine edilmiş örneklerde gözlemlenmiştir.



Şekil 1. a,b) Tohumdan kontaminasyon. c,d,e) 3. hafta kontaminasyon f) 4. hafta kontaminasyon

Sonuç

Bu çalışma göstermektedir ki hasat öncesinde olası bir *Salmonella* bulaşısı yeşil yapraklı taze tüketilen bitkide hasat zamanı yüksek sayıda canlı hücre kalmasına sebep olmakta ve bu hücreler yaprak yüzeyinde yıkamaya direnç oluşturacak şekilde tutunmaktadır. Bu nedenle olası bulaş ihtimallerinin, tohum ya da sulama suyu için, ortadan kalkması için gereken önlemler alınmalı olağandışı meydana gelen bulaşlar dikkate alınmalı ve tüketici sağlığına zararlı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Kaynaklar

Brandl, M.T. (2006) Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol* 44: 367–392.
Chitarra, W., Decastelli, L., Garibaldi, A., and Gullino, M.L. (2014) Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* from growth substrate into leaves of salad plants and basil grown in soil irrigated with contaminated water. *Int J Food Microbiol* 189: 139–145.
EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926, 276 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.592643> - ISO 6579-2.
Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., et al. (2010) The global burden of nontyphoidal salmonella gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50: 882–889.
Mercanoğlu Taban, B. and Halkman, A.K. (2011) Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe* 17: 286–287.

Teşekkür

Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (1001) 1180673 Numaralı projesinde finansal desteği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederiz.