

Aside Adapte Edilen *Salmonella typhimurium*'un Bazı Asidik Gıdalardaki Canlılığı

Halil TOSUN, Şahika Aktuğ GÖNÜL
Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.08.2002

Özet: Bu çalışmada *Salmonella typhimurium*'un aside adaptasyonunun mayonez, şalgam suyu ve ayrandaki canlılığına etkisi araştırılmıştır.

S. typhimurium pH 5,8'de hidroklorik aside maruz bırakılarak aside adapte edildi. Ticari olarak üretilen mayonez (pH 3,7), şalgam suyu (pH 3,1) ve ayran (pH 4,2) aside adapte edilen ve aside adapte edilmeyen *S. typhimurium* hücreleri ile inokule edildi (2×10^6 cfu/ml). Mayonez ve şalgam suyu 4 °C ve 20 °C'de ayran ise yalnızca 4 °C'de depolandı.

Aside adapte edilen *S. typhimurium* 4 °C'de, mayonezde 24 saat sonra ayran ise 48 saat sonra tespit edilirken aside adapte edilmeyen *S. typhimurium* mayonezde ve ayran bu sürelerde gelişme gösterememiştir.

Aside adaptasyon 4 °C'de depolanan ayran ve mayonezde *S. typhimurium*'un canlı kalma süresini artırmıştır.

4 °C ve 20 °C'de 120 dakika sonra aside adapte edilmeyen hücreler şalgam suyunda tespit edilemezken, aside adapte edilen hücreler 4 °C'de 15.000 cfu/ml ve 20 °C'de 900 cfu/ml düzeyinde tespit edilmiştir. Aside adapte edilen ve edilmeyen hücreler 24 saat sonra şalgam suyunda tespit edilememiştir.

Bu çalışma göstermiştir ki aside adaptasyon *S. typhimurium*'un bazı asidik gıdalardaki canlılığını artırmaktadır.

Anahtar Sözcükler: *S. typhimurium*, asidik gıdalar, aside adaptasyon

Survival of Acid Adapted *Salmonella typhimurium* in Some Acidic Foods

Abstract: This study examined the effect of adaptation to acid on the survival of *Salmonella typhimurium* in mayonnaise, turnip juice and ayran (a drink made of yogurt and water).

S. typhimurium was adapted to acid by exposure to hydrochloric acid at pH 5.8. Commercially available mayonnaise (pH 3.7), turnip juice (pH 3.1) and ayran (pH 4.2) were inoculated with acid adapted or nonadapted cells of *S. typhimurium* (2×10^6 cfu/ml). Mayonnaise and turnip juice were stored at 4 or 20 °C. Ayran was stored only at 4 °C.

Acid adapted *S. typhimurium* was detectable in mayonnaise at 4 °C after 24 h and in ayran after 48 h, whereas no nonadapted *S. typhimurium* survived in mayonnaise and ayran after these incubation times.

Adaptation to acid enhanced the survival of *S. typhimurium* in ayran and mayonnaise stored at 4 °C.

Nonadapted cells could not be detected in turnip juice after 120 min at 4 or 20 °C; however, acid adapted cells were detected at 15,000 cfu/ml (4 °C) and at 900 cfu/ml (20 °C). Nonadapted and acid adapted cells were not detected after 24 h of incubation in turnip juice.

This study showed that adaptation to acid enhanced the survival of *S. typhimurium* in some acidic foods.

Key Words: *Salmonella typhimurium*, acidic foods, acid adaptation

Giriş

Salmonella typhimurium son yıllarda asidik gıdalarda neden olduğu gıda kaynaklı zehirlenmelerle gündeme gelen bir patojendir.

Elma şarabı, portakal suyu, taze sıkılmış portakal suyu ve pastörize edilmemiş elma suyu *Salmonella* kaynaklı gıda zehirlenmelerine neden olmuştur (1,2). Evde yapılan

ve pastörize edilmemiş yumurta kullanılan mayonezlerin tüketimi sonucu dünyanın birçok ülkesinde *Salmonella* kaynaklı gıda zehirlenmeleri görülmektedir (3).

Son yıllarda fermente et ve süt ürünleri, yüksek asitli meyve suları ve mayonez gibi asidik gıdalardan (pH < 4,6) kaynaklanan gıda kaynaklı zehirlenmelerde, aside tolerans kazanmış patojen bakterilerin rol oynadığı görülmektedir

(4-6). Aside tolerans kazanma bazı patojen bakterilerin belirli bir süre orta derecede asitli (pH 5-6) ortamlara maruz kalması sonucu spesifik genler tarafından kontrol edilen asit şok proteinleri sentezleyerek yüksek asitli ortamlara direnç kazanması ile oluşur (7-9).

Bu konuda *S. typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* üzerinde birçok çalışma yapılmıştır (7,10,11).

Aside tolerans kazanmış patojen bakteriler hem gıda sanayi hem de insan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Çünkü gıdalarda patojen bakterilerin inhibisyonunda organik asitler önemli rol oynar. Bu tür gıdalarda aside tolerans kazanmış patojenler uzun süre canlı kalabilir. Ayrıca yapmış olduğumuz bir çalışmada aside adapte edilmiş *S. typhimurium*'un asetik asit ve laktik asite de direnç kazandığı bulunmuştur (12).

Bu çalışmada aside tolerans kazandırılan *S. typhimurium*'un bazı düşük pH'lı gıdalarda canlı kalma süreleri araştırılarak, aside tolerans kazanmanın *S. typhimurium*'un bu tür gıdalarda canlı kalmasına etki edip etmediği araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada *S. typhimurium* NRRL B 4420 suşu kullanılmıştır. E Glucose Medium hazırlamak için 10 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 g sitrik asit monohidrat, 500 g K_2HPO_4 ve 175 g $NaNH_4PO_4 \cdot 4H_2O$ tartılmış 670 ml suda eritilmiştir. Elde edilen 50 kat seyreltildikten sonra 99 ml çözelti içine % 0.4'lük glikoz çözeltisinden 1 ml ilave edilmiş, elde edilen çözelti 121 °C'de 15 dakika sterilize edilerek besiyeri hazırlanmıştır (13). Diğer besiyerleri ise Oxoid markadır.

Çalışmada mayonez, şalgam suyu ve ayran kullanılmıştır. Örnekler İzmir piyasasından temin edilmiştir. Örneklerin pH'sı sırasıyla 3,7; 3,1 ve 4,2'dir. Mayonez, bitkisel yağ, yumurta, su, sirke, tuz, şeker, limon suyu konsantresi ve çeşitli baharatlardan üretilmiştir. Şalgam suyu, su, tuz, siyah havuç ve şalgam turpundan, ayran ise su, tuz, yoğurt kültürü ve süttten üretilmiştir. Örnekler analize alınmadan önce Salmonella içerip içermedikleri kontrol edilmiş ve Salmonella içermedikleri görülmüştür.

S. typhimurium aside tolerans kazandırılmak için Minimal E Glucose Medium'da (13) bir gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. Buradan alınan kültür yeniden E

Glucose Medium'a inokule edilmiş ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. Kültürlerin absorbans değeri 600 nm'de 0,2'ye ulaştığında aside adapte edilecek kültürün pH'sı 10N HCl kullanılarak $5,8 \pm 0,1$ 'e ayarlanmış, kontrol kültürü ise pH 7,0'de 37 °C'de tutulmaya devam edilmiştir. Her iki kültür 37 °C'de absorbans değerleri 0,4'e ulaşınca santrifüjlenmiştir. Elde edilen hücre peleti, E tamponu (Glikoz içermeyen E Glucose Medium) ile süspanse edilerek yeniden santrifüjlenmiştir. Elde edilen pelet gıdalara, kültürlerin inokulasyonu amacıyla kullanılmıştır (9).

Örnekler 100 g'lık steril kavanozlara aktarılmış ve başlangıç hücre sayısı 2×10^6 /ml olacak şekilde kontrol kültürü ve aside adapte edilen kültür inokule edilmiştir. Şalgam suyu ve mayonez örnekleri 4 °C ve 20 °C'de, ayran örnekleri ise 4 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun belirli sürelerinde alınan örneklerin E tamponuyla dilüsyonları hazırlanmış ve paralel XLD petrilere yayma plak yöntemiyle ekimler yapılmıştır. 37 °C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra petrilere oluşan tipik Salmonella kolonileri sayılarak örneklerde canlı kalmış Salmonella sayıları tespit edilmiştir. Petrilere tipik Salmonella kolonilerinin görülmediği durumlarda örneklerde canlı hücre kalıp kalmadığı klasik Salmonella aranması yöntemi ile araştırılmıştır (14). Bunun için 25 ml veya gıda örneği 225 ml tamponlanmış peptonlu suda 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Buradan alınan 1 ml kültür Selenite Cystine Broth (SCB) ve Tetrathionate Brilliant Green Broth (TBGB)'a aktarılmış, SCB 37 °C'de, TBGB ise 43 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda her iki besiyerinden de XLD besiyerine yayma plak yöntemi kullanılarak ekim yapılmış ve petrilere 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri yüzeyinde oluşan tipik kolonilerden alınarak kanıtlama amacıyla biyokimyasal ve serolojik testler yapılmıştır.

Bulgular

Mayonez'de *S. typhimurium*'un Canlılığının Saptanması

Mayonezlere inokule edilen aside adapte edilmiş hücrelerin ve kontrol hücrelerinin hızla öldükleri görülmüştür. 4 °C'de inkübe edilen mayonezlerde 30. ve 90. dakikalarda alınan sayımlara göre aside adapte edilen hücrelerin, kontrol hücrelerine göre daha fazla sayıda canlı kaldığı görülmüştür. 24 saat sonra klasik yöntemle

Salmonella aranmış ve kontrol kültürü inokule edilen mayonezlerde Salmonella saptanamamışken, aside adapte edilen kültür inokule edilen mayonezlerde Salmonella saptanmıştır. 48 saat sonra ise hem aside adapte edilen kültür hem de kontrol kültürü mayonezde canlı kalamamıştır (Tablo 1).

20 °C'de inokule edilen mayonezlerde ise ilk 90 dakika aside adapte edilen kültürlerin sayısı kontrol kültürlerinden biraz fazladır. Ancak 24 saat sonra klasik yöntemle Salmonella aranmış ve hem aside adapte edilen kültürün hem de kontrol kültürünün mayonezde canlı kalamadığı görülmüştür (Tablo 1).

Şalgam Suyunda *S. typhimurium*'un Canlılığının Saptanması

Şalgam suyuna inokule edilen kontrol kültürü hem 4 °C hem de 20 °C'lik inkübasyonda bir saat sonra tamamen inhibe olmuştur. Aside adapte edilen kültür ise 4 °C'lik inkübasyonda 60 dakika sonra 2, 120 dakika sonra 4 log birim azalmıştır. 20 °C'lik inkübasyonda ise

60 dakika sonra 3, 120 dakika sonra yaklaşık 6 log birim azalmıştır. Görüldüğü gibi ilk 120 dakikalık inkübasyon süresi sonunda her iki inkübasyon sıcaklığında da şalgam suyunda aside adapte edilen kültürler daha fazla sayıda canlı kalmıştır. Ancak 24 saat sonra klasik yöntemle Salmonella arandığında hem kontrol hem de aside adapte edilen kültürün her iki inkübasyon sıcaklığında da gelişemediği görülmüştür (Tablo 2).

Ayranda *S. typhimurium*'un Canlılığının Saptanması

24 saat sonra aside adapte edilen kültür kontrol kültürüne göre ayranda 4,5 kat daha fazla sayıda canlı kalmıştır. 48 saat sonra kontrol kültürü tamamen inhibe olmuş iken aside adapte edilen kültür hala canlıdır. 72 saat sonra ise her iki kültürün de klasik yöntemle arandığında üründe tespit edilemediği görülmüştür. Aside adapte edilen *S. typhimurium* ayranda en az 48 saat canlı kalabilmektedir. Bu sonuç ayranın raf ömrünün kısa olması açısından önemlidir (Tablo 3).

Tablo 1. *S. typhimurium*'un 4 °C ve 20 °C'de depolanan mayonezdeki canlılığı.

	Aside Adapte Edilen <i>S. typhimurium</i>		Kontrol Kültürü	
	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
Başlangıç	2,1 x 10 ⁶ /g	2,1 x 10 ⁶ /g	2,1 x 10 ⁶ /g	2,1 x 10 ⁶ /g
30. Dakika	1,4 x 10 ⁵ /g	2,4 x 10 ⁵ /g	1,0 x 10 ⁵ /g	9,0 x 10 ³ /g
90. Dakika	3,7 x 10 ⁴ /g	7,2 x 10 ² /g	9,0 x 10 ³ /g	<10/g
24*. Saat	Pozitif/25 g	Negatif/25 g	Negatif/25 g	Negatif/25 g
48*. Saat	Negatif/25 g	Negatif/25 g	Negatif/25 g	Negatif/25 g

*24. ve 48. saatlerde klasik yöntemle Salmonella aranmıştır.

Tablo 2. *S. typhimurium*'un 4 °C ve 20 °C'de depolanan şalgam suyundaki canlılığı.

	Aside Adapte Edilen <i>S. typhimurium</i>		Kontrol Kültürü	
	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
Başlangıç	2,1 x 10 ⁶ /ml	2,1 x 10 ⁶ /ml	2,3 x 10 ⁶ /ml	2,3 x 10 ⁶ /ml
30. Dakika	1,2 x 10 ⁶ /ml	3,8 x 10 ⁴ /ml	1,5 x 10 ⁴ /ml	1,2 x 10 ³ /ml
60. Dakika	1,5 x 10 ⁴ /ml	9,0 x 10 ² /ml	<10/ml	<10/ml
120. Dakika	2,2 x 10 ² /ml	7,0 x 10 ¹ /ml	<10/ml	<10/ml
24*. Saat	Negatif/25 ml	Negatif/25 ml	Negatif/25 ml	Negatif/25 ml

*24. saatte klasik yöntemle Salmonella aranmıştır.

Tablo 3. *S. typhimurium*'un 4 °C'de depolanan ayrandaki canlılığı.

	Aside Adapte Edilen <i>S. typhimurium</i>	Kontrol Kültürü
	4 °C	4 °C
Başlangıç	2,0 x 10 ⁶ /ml	2,0 x 10 ⁶ /ml
24. Saat	8,5 x 10 ⁶ /ml	1,7 x 10 ² /ml
48. Saat	7/ml	<10/ml
72*. Saat	Negatif/25 ml	Negatif/25 ml

*72. saatte klasik yöntemle *Salmonella* aranmıştır.

Tartışma

Bu çalışmada raf ömrü bir yıl olan mayonezlerde *S. typhimurium*'un yaklaşık 6 log birim azalarak inhibe olduğu görülmüştür. Burada ürün pH'sının düşük olması oldukça önemlidir. Asetik asit içeren ve pH'sı 3,9'dan düşük olan ticari mayonezlerde, mayonez formülasyonu ve sıcaklıktan bağımsız olarak başlangıç bakteri yüküne göre 10⁶/ml düzeyinde *Salmonella*'nın inaktif olduğu bulunmuştur (15). Ancak 4 °C'lik inkübasyonda 24 saat sonra aside adapte edilen kültürün canlı kalması aside adaptasyonun mayonezde *S. typhimurium*'un canlı kalma süresini artırdığını göstermektedir. Bu durum özellikle evde yapılan içeriğinde çiğ yumurta kullanılan ve ticari mayonezlere göre daha yüksek pH'da hazırlanan ve kısa sürede tüketilen mayonezlerde risk oluşturabilir. Ev tipi mayonezlerde güvenliğin sağlanması için yapıldıktan sonra

48 saat bekletilmesi önerilebilir. Ayrıca FDA (Food and Drug Administration) ticari üretilen mayonezlerin, pastörize edilmemiş yumurta kullanılması durumunda 72 saat bekletilmesini önermektedir (16). 20 °C'de inkübe edilen mayonezlerde ise hem kontrol hem de aside adapte edilen kültürler hızla inhibe olmuştur. Bu sonuç ise mayonezde, aside adaptasyonun soğuk koşullarında bakterinin direncini daha çok artırdığını göstermektedir.

Şalgam suyunun oldukça düşük pH'sı ve fermente bir gıda olması ürünün güvenli olmasını sağlamaktadır. Şalgam suyunun pH'sı 3,1'dir. Bu pH değerinde *S. typhimurium*'un aside tolerans kazanmış olması onun şalgam suyunda canlı kalma süresini artıramamıştır.

Aside adapte edilen kültür ayıranda iki gün boyunca canlı kalabilmekte ve ancak üçüncü gün ölmektedir. Bu süre, kısa sürede tüketilen ayran için oldukça önemlidir. Şalgam suyu ve mayonez denemelerinde de görüldüğü gibi ürünün buzdolabı koşullarında depolanması aside tolerans kazanmış *S. typhimurium* hücrelerinin sayısını azaltmamakta tam aksine 20 °C'de depolamaya göre artırmaktadır.

Sonuç olarak son yıllarda yüksek asitli gıdalardan kaynaklanan hastalıklar aside adapte olan patojenler ile ilgili çalışmaları gündeme getirmiştir. Yüksek asitli gıdalara uygulanan ısıl işlem veya diğer koruyucu yöntemler belirlenirken aside adapte olabilen patojen bakterilerin bu tür gıdalarda daha uzun süre canlı kalabileceği dikkate alınmalıdır.

Kaynaklar

1. Parish, M.E., Narciso, J.A., Friedrich, L.M.: Survival of *Salmonella* in Orange Juice. *J. Food Safety*. 1997; 17: 273-281.
2. Tsai, Y.W., Ingham, S.C.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in Acidic Condiments. *J. Food Prot.*, 1997; 60: 751-755.
3. Smittle, R.B.: Microbiological Safety of Mayonnaise Salad Dressing and Sauces Produced in the United States: A Review. *J. Food Prot.*, 2000; 63: 1144-1153.
4. Hathcox, A.K., Beuchat, L.R., Doyle, M.P.: Death of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Real Mayonnaise and Reduced Calorie Mayonnaise Dressing as Influenced by Initial Population and Storage Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; 61: 4172-4177.
5. Raghubeer, E. V., Ke, J.S. K., Campbell, M.L., Meyer, R.S.: Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Coliforms in Commercial Mayonnaise and Refrigerated Salad Dressing. *J. Food Prot.*, 1995; 58: 13-18.
6. Weagant, S.D., Bryant, J.C., Bark, D.H.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Mayonnaise and Mayonnaise Based Sauces at Room and Refrigerated Temperatures. *J. Food Prot.*, 1994; 57: 629-631.
7. Foster, J.W., Hall, H.K.: Adaptive Acidification Tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1990; 172: 771-778.
8. Foster, J.W.: *Salmonella* Acid Shock Proteins are Required for the Adaptive Acid Tolerance Response. *J. Bacteriol.*, 1991; 173: 6896-6902.
9. Foster, J.W., Hall, H.K.: Inducible pH Homeostasis and the Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1991; 173: 5129-5135.
10. Gahan, C.G.M., O'Driscoll, B., Hill, C.: Acid Adaptation of *Listeria monocytogenes* Can Enhance Survival in Acidic Foods and during Milk Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996; 62: 3128-3132.

11. Hickey, E.V., Hirshfield, I.N.: Low pH Induced Effects on Patterns of Protein Synthesis and Internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Appl. Environ. Microbiol., 1990; 56: 1038-1043.
12. Tosun, H., Gönül, A.Ş.: Acid Adaptation Protects *Salmonella typhimurium* from Environmental Stresses. Turk J. Biol., 2003; 27: 31-36.
13. Vogel, H.N., Bonner, D.M.: Acetylornithinase of *Escherichia coli* Partial Purification and Some Properties. J. Biol. Chem. 1956; 93: 273-284.
14. Karapınar, M.: Gıdaların Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü. Ege Üniv. Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları. Yayın No: 6, 1995.
15. Membre, J.M., Majchrzak, V., Joccy, I.: Effects of Temperature, pH, Glucose and Citric Acid on the Inactivation of *Salmonella typhimurium* in Reduced Calorie Mayonnaise. J. Food Prot., 1997; 60: 1497-1501.
16. Erickson, J.P., Jenkins, P.: Comparative *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* Inactivation Rates in Four Commercial Mayonnaise Products. J. Food Prot., 1991; 54: 913-916.