

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***CRONOBACTER SAKAZAKII* 'NİN BEBEK MAMALARINDAN
İZOLASYONU VE GELİŞME PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ**

Gökçe POLAT YEMİŞ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

CRONOBACTER SAKAZAKII'NİN BEBEK MAMALARINDAN İZOLASYONU VE GELİŞME PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

Gökçe POLAT YEMİŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Cronobacter sakazakii, bebeklerde ve çocuklarda hayati tehlike yaratan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarının önemli bir sebebidir. Çeşitli klinik vakalarda *C. sakazakii* enfeksiyonu ile bebek maması tüketimi epidemiyolojik olarak ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada, toz formdaki bebek maması, bebek ek gıdası ve bileşenlerinde *C. sakazakii* izolasyonu ve moleküler identifikasyonu gerçekleştirilmiş, ardından bakterinin farklı sıcaklık ve pH koşullarındaki davranışları incelenmiştir. Araştırma kapsamında bebek mamasında patojenin hızlı tanısı için direkt PCR yöntemi üzerine modifikasyon çalışmaları yapılmıştır. İncelenen bebek mamalarının hiçbirinde *C. sakazakii* belirlenmemiştir. Buna karşın bebek ek gıdaları içerisinde yalnızca tahıl bazlı ek gıdada *C. sakazakii* saptanmıştır. Analiz edilen bileşen grubundan, tahıl ürünlerinin % 82.9'unun *Enterobacteriaceae* ile kontamine olduğu, bunlardan % 60'nın *C. sakazakii*, % 32'sinin *E. cloacae*, % 20'sinin *K. pneumoniae* ve % 20'sinin *E. agglomerans* içerdiği saptanmıştır. *C. sakazakii* suşlarının rekonstitüe bebek mamasında 4 °C'da gelişim göstermediği ve depolama süresince bakteri sayılarında azalma olduğu gözlenmiştir. Suşların logaritmik fazda 10, 20 ve 30 °C'da ortalama jenerasyon sürelerinin sırasıyla 9.31±1.13, 1.09±0.03 ve 0.51±0.02 saat olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak *C. sakazakii* suşlarının asit pH'ya önemli ölçüde direnç gösterdiği saptanmış ve *C. muytjensii* ATCC 51329 dışında incelen diğer dört suşun 6 saat boyunca pH 3.5'de canlı kaldığı belirlenmiştir. Analize alınan *C. sakazakii* suşlarının farklı sıcaklıklardaki ısıl dirençlerinin değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. D değerlerinin 54, 56 ve 58 °C'da sırasıyla 2.96-12.21, 1.10-4.27 ve 0.29-1.19 dakika aralığında olduğu belirlenmiştir. z değerlerinin ise 0.36-1.50 °C olduğu saptanmıştır. Bebek mamasında yalnızca 4 saatlik bir ön zenginleştirme sonrası uygulanan direkt PCR yöntemi ile 1 kob/mL seviyesinde *Cronobacter* spp. belirlenebilmiştir. *Cronobacter* spp. tespitinde uygulanan PCR yönteminin kültürel belirleme yöntemlerine oranla daha hızlı ve daha duyarlı olduğu saptanmıştır.

Ekim 2011, 120 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Cronobacter sakazakii*, bebek maması, izolasyon, moleküler tanı, 16S rRNA, gelişme parametreleri, direkt PCR

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ISOLATION OF *CRONOBACTER SAKAZAKII* FROM POWDERED INFANT FORMULA AND INVESTIGATION OF GROWTH PARAMETERS

Gökçe POLAT YEMİŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor : Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Cronobacter sakazakii causes meningitis, sepsis, and necrotizing enterocolitis in neonates and infants. *C. sakazakii* infections have been epidemiologically associated with consumption of reconstituted powdered infant formula. In this study, isolation and molecular identification of *C. sakazakii* from powdered infant formula, infant food and its ingredients were performed, and investigated the growth of *C. sakazakii* at different pH and temperature. In addition, it was determined the thermal resistance of *C. sakazakii* and modified PCR method for the rapid detection *C. sakazakii* in infant formula. *C. sakazakii* was not detected in any infant formula that analyzed. However, *C. sakazakii* was detected in only cereal based infant food. It was found that 82.9% of cereal products were contaminated by *Enterobacteriaceae* and, 60%, 32%, 20% and 20% of them were *C. sakazakii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* and *E. agglomerans*, respectively. None of the *C. sakazakii* strains grew at 4 °C and populations decreased during storage. The average generation times for *C. sakazakii* strains at 10, 20 and 30 °C in reconstituted infant formula were 9.31±1.13, 1.09±0.03 and 0.51±0.02, respectively. *C. sakazakii* strains were generally resistant in acidic pH. The other four strains of *C. sakazakii*, except for *C. muytjensii* ATCC 51329, were shown to survive at pH 3.5 during 6 hours. *C. sakazakii* strains showed a wide variability in heat resistance at different temperatures. The *D*-values of *C. sakazakii* strains at 54, 56 and 58 °C were ranged from 2.96-12.21 min., 1.10-4.27 min., 0.29-1.19 min., respectively. The *z*-values for the studied *C. sakazakii* strains calculated as 0.36-1.50 °C. Detection limit of PCR assay for *Cronobacter* spp. was determined to be 1 cfu/mL after 4-h of enrichment step in infant formula. The result showed that the modified PCR based technique described in this study was found more rapid and sensitive than the conventional methods for detection of *Cronobacter* spp. from infant formula.

October 2011, 120 pages

Key Words : *Cronobacter sakazakii*, infant formula, isolation, molecular identification, 16S rRNA, growth parameters

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca beni destekleyen, bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren ve birlikte çalışmış olmaktan mutluluk duyduğum sevgili danışman Hocam, Sayın Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Her ihtiyacım olduğunda yardımını esirgemeyen ve içten dostluğuna inandığım eş danışmanım Sayın Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR'a (Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Bilgi ve önerileri ile tezime yön veren Tez İzleme Komitesinin değerli üyeleri Sayın Prof. Dr. Kamuran AYHAN (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Ayhan TEMİZ'e (Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Çalışmamın deneysel aşamalarının bir bölümünü laboratuvarlarında gerçekleştirdiğim Sayın Prof. Dr. Lütfü ÇAKMAKÇI (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

DNA dizi analizlerinin gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) ve Uzm. Bio. Nilgün TEKİN'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Tez çalışmam süresince her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Deniz KOÇAN, Dr. Fatma YAMAN, Mustafa GAYRETLİ, Ayşe Gamze KORKMAZ, Arş. Grv. Evrim ALTUNTAŞ, Aylin AKOĞLU, Arş. Grv. Mehmet TOKATLI ve Arş. Grv. Simel BAĞDER'e,

08B4343004 numaralı proje ile tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'ne,

Beni her konuda destekleyen ve her zaman yanımda olan sevgili eşime ve aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Gökçe POLAT YEMİŞ

Ankara, Ekim 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 <i>Cronobacter</i> spp.'nin Taksonomisi ve Biyokimyasal Özellikleri	3
2.2 <i>Cronobacter</i> spp.'nin Kontaminasyon Kaynakları	7
2.3 <i>Cronobacter</i> spp.'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar ve Patojenite	11
2.4 İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri.....	15
2.5 Termal Direnç, Ozmotik Ortam ve Depolama Koşullarında Direnç	21
2.6 Antibiyotiklere Karşı Dirençlilik.....	23
2.7 <i>Cronobacter</i> spp. İnaktivasyonu.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1 Materyal	27
3.1.1 Bebek maması, bebek ek gıdası ve bileşen örnekleri	27
3.1.2 Bakteri kültürü.....	27
3.1.3 Besiyerleri	27
3.1.4 Enzimler ve kimyasallar	28
3.2 Yöntem	28
3.2.1 <i>Cronobacter</i> spp. izolasyonu	28
3.2.2 Toplam aerobik mezofil bakteri, koliform bakteri ve <i>Enterobacteriaceae</i> sayımı	28
3.2.3 Morfolojik ve biyokimyasal identifikasyon	28
3.2.4 Moleküler identifikasyon.....	29
3.2.4.1 DNA izolasyonu	30
3.2.4.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	31
3.2.4.3 Agaroz jel elektroforezi	34
3.2.4.4 DNA dizi analizi	34
3.2.4.5 16S rRNA sekans dizilerinin gen bankasındaki verilerle karşılaştırılması	36
3.2.5 <i>C. sakazakii</i> suşlarının farklı sıcaklık koşullarında gelişimi	36
3.2.5.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması	36
3.2.5.2 Bebek maması örneği.....	36
3.2.5.3 Bebek maması örneklerinin inokülasyonu ve farklı sıcaklıklarda depolanması	37
3.2.5.4 <i>C. sakazakii</i> suşlarının jenerasyon sürelerinin hesaplanması	37
3.2.6 <i>C. sakazakii</i> suşlarının farklı pH koşullarında gelişimi	38
3.2.6.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması	38
3.2.6.2 <i>C. sakazakii</i> suşlarının pH 3.5'de gelişimi	38
3.2.6.3 <i>C. sakazakii</i> suşlarının farklı pH değerlerinde gelişimlerinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi	38
3.2.7 <i>C. sakazakii</i> suşlarının termal dirençleri.....	39
3.2.7.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması	39

3.2.7.2 Bebek maması örneği.....	39
3.2.7.3 Bebek maması örneklerinin inokülasyonu ve termal direnç denemesi.....	39
3.2.7.4 <i>D</i> ve <i>z</i> değerlerinin hesaplanması	40
3.2.8 Direkt PCR yöntemi ile bebek mamalarında <i>Cronobacter</i> spp. tespiti.....	40
3.2.8.1 Bebek maması örneklerinin inokülasyonu	40
3.2.8.2 DNA izolasyonu	41
3.2.8.3 PCR amplifikasyonu	42
3.2.8.4 Agaroz jel elektroforezi	42
3.2.9 İstatistiksel değerlendirme	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	44
4.1 <i>Cronobacter</i> spp. İzolasyonu ve Biyokimyasal İdentifikasyon Sonuçları.....	44
4.2 Moleküler İdentifikasyon Sonuçları.....	54
4.2.1 DNA izolasyon sonuçları	54
4.2.2 PCR analiz sonuçları	55
4.2.3 DNA dizi analizi sonuçları.....	56
4.3 <i>C. sakazakii</i> Suşlarının Farklı Sıcaklık Koşullarında Gelişimi	61
4.4 <i>C. sakazakii</i> Suşlarının Jenerasyon Süreleri	64
4.5 <i>C. sakazakii</i> Suşlarının Farklı pH Koşullarında Gelişimi	66
4.6 <i>C. sakazakii</i> Suşlarının Termal Dirençleri	69
4.7 Direkt PCR Yöntemi ile Bebek Mamalarında <i>Cronobacter</i> spp. Tespiti.....	73
4.7.1 Bebek mamalarından <i>Cronobacter</i> spp. tespitinde direkt PCR yönteminin duyarlılığı.....	73
4.7.2 Direkt PCR yöntemi ile bebek mamalarından ön zenginleştirme işlemi ile <i>Cronobacter</i> spp. tespiti	76
5. SONUÇ	80
KAYNAKLAR	82
EKLER.....	93
EK 1 Termal inaktivasyon sonuçları.....	94
EK 2 Farklı sıcaklık koşullarında gelişme sonuçları	97
EK 3 Araştırmada kullanılan besiyerleri.....	99
EK 4 Araştırmada kullanılan çözeltiler	102
EK 5 DNA dizi analizi sonuçları.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	120

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

a_w	Su aktivitesi
bç	Baz çifti
CTAB	Heksadesiltrimetil amonyum bromid
D	Desimal azalma süresi
DNA	Deoksiribonükleik asit
dATP	Deoksiadenin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EMS	En muhtemel sayı
EtOH	Etil alkol
FDA	Food and Drug Administration
IDF	International Dairy Federation
ISO	International Organization for Standardization
kGy	KiloGray
kob	Koloni oluşturan birim
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris - Borik asit - EDTA
TE	Tris - EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bebek maması tüketimi sırasındaki olası kontaminasyon kaynakları ve risk faktörleri.....	10
Şekil 2.2 <i>Cronobacter</i> spp. tespitinde kullanılan protokoller.....	18
Şekil 3.1 <i>Cronobacter</i> spp. izolasyonu.....	29
Şekil 4.1 <i>Cronobacter</i> spp. izolatlarından elde edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri	55
Şekil 4.2 <i>Cronobacter</i> spp. izolatlarına ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.....	56
Şekil 4.3 <i>Cronobacter</i> spp.'nin α -glukosidase aktivitesi sonucu DFI Agar ve TSA'da oluşturduğu tipik koloniler	57
Şekil 4.4 Tanısı yapılan <i>Cronobacter</i> izolatları ile referans bakterilerin 16S rRNA dizileri temel alınarak oluşturulan filogenetik ağaç	59
Şekil 4.5 <i>C. sakazakii</i> suşlarının 4 °C'deki gelişimi	61
Şekil 4.6 <i>C. sakazakii</i> suşlarının 10 °C'deki gelişimi	62
Şekil 4.7 <i>C. sakazakii</i> suşlarının 20 °C'deki gelişimi	63
Şekil 4.8 <i>C. sakazakii</i> suşlarının 30 °C'deki gelişimi	63
Şekil 4.9 <i>C. sakazakii</i> suşlarının pH 3.5'deki gelişimi	67
Şekil 4.10 <i>C. sakazakii</i> suşlarının pH 4.5, pH 5.5 ve pH 7.0'deki gelişim eğrileri	68
Şekil 4.11 <i>C. sakazakii</i> suşlarının 54 °C'da termal inaktivasyonu	71
Şekil 4.12 <i>C. sakazakii</i> suşlarının 56 °C'da termal inaktivasyonu	72
Şekil 4.13 <i>C. sakazakii</i> suşlarının 58 °C'da termal inaktivasyonu	72
Şekil 4.14 Rekonstitüe bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile <i>Cronobacter</i> spp. tespiti (DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen yöntem)	73
Şekil 4.15 Rekonstitüe bebek mamasından direkt PCR yöntemi ile <i>Cronobacter</i> spp. tespiti (kaynatma yöntemi).....	74
Şekil 4.16 <i>Cronobacter</i> türlerine özgü primerlerin spesifikliğinin tespiti	75
Şekil 4.17 Rekonstitüe bebek mamasından ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile <i>Cronobacter</i> spp. tespiti (DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen yöntem).....	76
Şekil 4.18 Rekonstitüe bebek mamasından ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile <i>Cronobacter</i> tespiti (kaynatma yöntemi).....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Cronobacter</i> türleri arasındaki biyokimyasal farklılıklar	5
Çizelge 2.2 <i>Cronobacter</i> türleri ile <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler	6
Çizelge 2.3 Dünya üzerindeki neonatal <i>Cronobacter</i> spp. salgınları.....	13
Çizelge 3.1 <i>Cronobacter</i> türlerine özgü primer dizileri.....	32
Çizelge 3.2 PCR bileşenlerinin miktar ve konsantrasyonları.....	32
Çizelge 3.3 PCR cihazında ayarlanan döngülerin sıcaklık ve süreleri.....	33
Çizelge 3.4 Araştırma kapsamında kullanılmak üzere seçilen izolatlar ve kaynakları...	36
Çizelge 3.5 PCR bileşenlerinin miktarları	42
Çizelge 4.1 Bebek ve devam formüllerinin mikrobiyolojik özellikleri	44
Çizelge 4.2 Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları mikrobiyolojik özellikleri.....	45
Çizelge 4.3 Bebek maması ve bebek ek gıdası bileşenlerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	47
Çizelge 4.4 Bebek ek gıdası ve bebek maması bileşenlerinden izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.....	50
Çizelge 4.5 <i>Cronobacter</i> spp. izolatlarına ait biyokimyasal identifikasyon ve 16S rRNA sekans analizi sonuçları.....	57
Çizelge 4.6 <i>C. sakazakii</i> suşlarının jenerasyon süreleri	64
Çizelge 4.7 <i>C. sakazakii</i> suşlarının pH 3.5'deki gelişimi	66
Çizelge 4.8 <i>C. sakazakii</i> suşlarının <i>D</i> ve <i>z</i> değerleri	69

1. GİRİŞ

Son yıllarda önemi artan bir patojen olan *Cronobacter* spp. (eski adı ile *Enterobacter sakazakii*), bebeklerde hayati risk oluşturan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Henüz tam olgunlaşmamış bağırsak yapısına sahip olan; prematüre, 28 günden küçük, düşük doğum ağırlığına sahip ve medikal bakım gören bebekler *Cronobacter* spp. enfeksiyonu riski altındadır. *Cronobacter* spp. enfeksiyonunun görülme oranı 12 aydan küçük bebekler için 1/100 bin iken, düşük doğum ağırlığına (<1500 g) sahip bebeklerde bu oran 9.4/100 bin'dir. Doğal yaşam alanı bilinmemekle beraber; bakteri gıdadan, çevreden ve farklı klinik kaynaklardan izole edilmiştir. Yenidoğan bebeklerde görülen enfeksiyonlar sebebiyle *Cronobacter* spp.'nin, bebek maması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Salgınlar da çoğunlukla yenidoğan bakım ünitelerinde gerçekleşmektedir. *Cronobacter* spp. ozmotik ortam ve kurutma gibi çevresel stres koşullarına diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine kıyasla daha dirençlidir ve düşük su aktivitesine sahip olan bebek mamasında (0.25-0.5 a_w) uzun süre canlılığını korumaktadır. Ancak, epidemiyolojik araştırmalar bebek mamasının yanı sıra, hastane ortamlarında mamaların hazırlanması için kullanılan araç-gereçleri de kontaminasyon kaynağı olarak göstermiştir.

Uluslararası Mikrobiyolojik Spesifikasyonlar Komisyonu (International Commission on Microbiological Specifications for Foods; ICMSF) *Cronobacter* spp.'yi potansiyel olarak yaşamı tehdit eden ya da önemli kronik sekellere yol açan ciddi bir tehlike olarak tanımlamış ve *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tip A ve tip B gibi gıda kaynaklı ya da *Cryptosporidium parvum* gibi su kaynaklı patojenler ile aynı grupta yer almasına karar vermiştir. Bakterinin, yeni doğmuş bebeklerin üst gastrointestinal sistemlerinde düşük pH koşullarıyla karşılaşmayacağı ve hızla ince bağırsaklara geçerek enfeksiyona neden olabileceği belirtilmiştir. *Cronobacter* spp. ilk kez 1958 yılında İngiltere'de iki bebeğin ölümü ile sonuçlanan bir salgında yenidoğanlarla ilişkilendirilmiştir. Son dönemde yapılan araştırmalarda ise *Cronobacter* türleri içerisinde yalnızca *C. sakazakii*, *C. malonaticus* ve *C. turicensis*'in neonatal enfeksiyonlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bakteri, en çok yeni doğmuş bebekler ve 3 günlük ile 4 yaş arası çocuklarda hastalığa neden olarak kendini göstermiş olup, şimdiye

kadar bebek ve çocuklarda yaklaşık 156 adet *Cronobacter* spp. enfeksiyonu vakası ve 29 adet ölüm (% 19) rapor edilmiştir. Bu salgınlarda hastalığa yakalanan bebeklerde ölüm oranının % 40-80 olduğu ve hayatta kalanlar için süregelen sorunların nörolojik rahatsızlıklarla sonuçlanabildiği bildirilmiştir. Bunun üzerine toz bebek maması kullanımı ile ortaya çıkan enfeksiyon riskini azaltmak için uygun stratejilerin uygulamasına yönelik çabalar artmıştır.

Ülkemizde geçerli kayıt sistemlerinin henüz yeterli düzeye erişmemiş olması nedeniyle şimdiye kadar bebek maması kontaminasyonuna bağlı olarak gelişen *Cronobacter* spp. enfeksiyonu bildirilmemiştir. Ancak son dönemde birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de bebek ve devam formülleri ile bebek ek gıdalarına ait mikrobiyolojik kriterler yeniden gözden geçirilmiş ve 2009 yılı itibariyle Türk Gıda Mevzuatı Bebek ve Devam Formülleri Tebliği'nde yer alan mikrobiyolojik kriterlerde *Cronobacter* spp.'ye ilişkin yeni bir düzenleme getirilmiştir. *Cronobacter* spp.'nin neden olduğu enfeksiyon vakalarının sıklığı son yıllarda artış göstermesine rağmen ülkemizde halen bu bakteri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu bakterinin ülkemizdeki bebek mamalarındaki yaygınlığı ve düzeyinin belirlenmesi, bakterinin üreme karakteristikleri, virulens faktörleri ve hızlı tanısına yönelik konularda ayrıntılı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Bu tez çalışması ile öncelikle ülkemizdeki bebek mamaları, bebek ek gıdaları ve bileşenlerinin *C. sakazakii* yönünden mikrobiyolojik kalitesi ve risk potansiyelinin ortaya konulması, *C. sakazakii*'nin sıcaklık, pH gibi farklı stres koşullarındaki davranışlarının incelenmesi ve PCR temelli moleküler teknik kullanılarak *C. sakazakii*'nin tespitinde klasik kültürel belirleme yöntemine kıyasla daha hızlı ve duyarlı bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Cronobacter* spp.'nin Taksonomisi ve Biyokimyasal Özellikleri

Cronobacter spp., *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram negatif, fakültatif anaerob, çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen, peritrik flagella ile hareketli bir bakteridir. *Cronobacter* spp. önceleri *Enterobacter cloacae*'nin sarı pigment veren bir tipi olarak tanımlanırken, 1980 yılında DNA-DNA hibridizasyonu, biyokimyasal reaksiyonları, pigment üretimi ve antibiyotik duyarlılıklarındaki farklılıklar nedeniyle yeni bir tür olarak adlandırılmıştır (Farmer vd. 1980, Nazarowec-White ve Farber 1997a, Iversen ve Forsythe 2003, Lehner ve Stephan 2004, Gurtler vd. 2005, Drudy vd. 2006, Mullane vd. 2006).

Adını Japon bir mikrobiyolog olan Riichi Sakazaki'den alan ve *E. sakazakii* olarak bilinen bu bakterinin menenjit etmeni olduğuna dair ilk açıklama, Urmenyi ve Franklin (1961) tarafından yapılmıştır. 1958 yılında, İngiltere'nin St. Albans bölgesinde yeni doğmuş iki bebekteki menenjit vakasında ve daha sonra Danimarka'da menenjitten sağ kurtulan fakat çeşitli zihinsel ve nörolojik bozukluklar yaşayan bir çocukta hastalık etmeni atipik sarı pigmentli *E. cloacae* olarak kaydedilmiştir. *E. sakazakii* isminin kayıtlara geçmiş ilk kullanımı, Farmer ve Brenner (1977) tarafından yapılmıştır. Bakteri için daha önceden kullanılan beş isim Urmenyi ve Franklin basili, sarı koliform, sarı *Enterobacter*, pigmentli *cloacae* A organizması ve özellikle de sarı pigmentli *E. cloacae*'dir (Iversen ve Forsythe 2003, Gurtler vd. 2005).

E. sakazakii'nin *Enterobacter* ve *Citrobacter* ile % 53-54 oranında yakınlık gösterdiği, *Citrobacter freundii* ile % 41, *E. cloacae* ile de % 51 oranında ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bunun ardından mikroorganizmanın fenotipik açıdan *E. cloacae*'ye daha yakın olmasından dolayı *Enterobacter* cinsinde yer almasına karar verilmiştir. DNA-DNA hibridizasyonu ile yapılan çalışmalar sonunda sarı pigmentli suşların, pigmentsiz suşlarla % 50'den az homoloji gösterdiğinin belirlenmesi üzerine sarı pigmentli *E. cloacae*'nin yeni bir türü kapsamı gerektiği öne sürülmüştür (Farmer vd. 1980, Gurtler vd. 2005).

E. sakazakii'nin D-sorbitol negatif olması, DNaz testinde geç pozitif sonuç vermesi ve Tryptic Soy Agarda 25 °C'daki inkübasyonda yayılmayan sarı renkli bir pigment üretmesi ile *E. cloacae*'dan ayrıldığı belirlenmiştir (Farmer vd. 1980). Test edilen 129 adet *E. sakazakii* suşunun tamamında α -glucosidaz aktivitesi belirlenmesine karşın, *E. aerogenes*, *E. cloacae* ve *E. agglomerans*'ı içine alan diğer 97 adet *Enterobacter* türünün hiçbirinde bu tür bir aktiviteye rastlanmamıştır (Mutyjens vd. 1984). *E. sakazakii* izolatlarının % 97.3'ünün, ayrıca süttozu ve bebek mamasından izole edilen 6 adet suşun 25 ve 37 °C'da 7 gün inkübasyondan sonra Tween-esteraz ürettiği tespit edilmiş ve enzimin *E. sakazakii*'yi, Tween-esteraz negatif olan *E. cloacae*'dan ayırmak için kullanılabileceği belirtilmiştir (Aldova vd. 1983).

Son yapılan polifazik taksonomik çalışmalar sonucu *E. sakazakii*, *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde *Cronobacter* olarak adlandırılan yeni bir cins altında altı yeni tür (*Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter turicensis* ve *Cronobacter* genomospecies I) ve üç yeni alt tür (*Cronobacter dublinensis* ssp. *dublinensis*, *Cronobacter dublinensis* ssp. *lactaridi*, *Cronobacter dublinensis* ssp. *lausannensis*) olarak yeniden sınıflandırılmıştır. (Iversen vd. 2007, 2008). Yeni sınıflandırmaya göre *Cronobacter* genomospecies I dışındaki beş *Cronobacter* türü 16 biyogruba ayrılmıştır:

- *C. sakazakii* (Biyogrup 1-4, 7, 8, 11, 13)
- *C. malonaticus* (Biyogrup 5, 9, 14)
- *C. dublinensis* (Biyogrup 6, 10, 12)
- *C. muytjensii* (Biyogrup 15)
- *C. turicensis* (Biyogrup 16)

Iversen vd. (2007, 2008), 210 adet *Cronobacter* suşunu içeren bir koleksiyonun fenotipik özelliklerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları kapsamlı bir araştırmada, *Cronobacter* türlerindeki biyokimyasal farklılıkları ortaya koyacak temel biyokimyasal testleri tanımlamışlardır. *Cronobacter* türleri arasındaki biyokimyasal farklılıklar çizelge 2.1'de, *Cronobacter* türleri ile *Enterobacteriaceae* üyelerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler ise çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 *Cronobacter* türleri arasındaki biyokimyasal farklılıklar (Iversen vd. 2007)

Biyokimyasal testler	CS	CM	CT	CG	CMY	CDD	CDL	CDLS
İndol üretimi	-	-	-	-	+	+	+	v
Dulsitol	-	-	+	+	+	-	-	-
Laktuloz	+	+	+	+	+	+	+	-
Malonat	-	+	+	v	+	+	-	-
Maltitol	+	+	+	+	-	+	+	-
Palatinoz	+	+	+	+	v	+	+	+
Putresin	+	v	+	v	+	+	+	v
Melezitoz	-	-	+	-	-	+	-	-
Turanoz	+	+	+	v	v	+	v	-
myo-İnositol	v	v	+	+	+	+	+	-
cis-Asonitat	+	+	+	+	v	+	+	+
trans-Asonitat	-	+	-	+	v	+	+	+
1-0-methyl α -D-glcpyr	+	+	+	+	-	+	+	+
4-Aminobütirat	+	+	+	v	+	+	+	+

CS, *C. sakazakii*; CM, *C. malonaticus*; CT, *C. turicensis*; CG, *C. genomospecies I*; CMY, *C. muytjensii*; CDD, *C. dublinensis* ssp. *dublinensis*; CDL, *C. dublinensis* ssp. *lactaridi*; CDLS, *C. dublinensis* ssp. *lausannensis*; +, > % 90 pozitif; (+), v, % 20-80 pozitif; -, < % 10 pozitif

Cronobacter spp., besiyeri ve suşa bağlı olarak parlak ve mat olacak şekilde iki koloni tipi oluşturmaktadır. Tryptic Soy Agarda oluşan koloni çaplarının, 36 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra 2-3 mm, 25 °C'da 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonrasında sırasıyla 1-1.5 ve 2-3 mm olduğu belirlenmiştir. Sıvı besiyerinde gelişen *Cronobacter* spp.'nin kümelenme ve sediment oluşturma eğiliminde olduğu gözlenmiştir (Farmer vd. 1980, Nazarowec-White ve Farber 1997b, Iversen ve Forsythe 2003).

Cronobacter spp. 6-47 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmektedir. *Cronobacter* spp.'nin gelişme sıcaklığı aralığı Farmer vd. (1980) tarafından 57 suşa araştırılmıştır. Buna göre, 4 ve 50 °C'da gelişme olmazken, suşların çoğu 47 °C'da gelişim göstermiştir. Kindle vd. (1996), *Cronobacter* spp. ve *Klebsiella pneumoniae*'nin test edilen diğer mikroorganizmalara göre (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium terrae* ve *Candida albicans*) rekonstitüe bebek mamasında daha hızlı geliştiklerini tespit etmişlerdir.

Çizelge 2.2 *Cronobacter* türleri ile *Enterobacteriaceae* üyelerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler (Iversen vd. 2008)

	4-NP- α -Glc	VP	ADH	ODC	SAC	RAF	CEL	ARA	CIT	MR	ADO	SOR	LDC	H ₂ S
<i>Cronobacter</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Buttiauxella agrestis</i>	v	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	-	-	v	+	v	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	v	-	v	v	v	+	v	+	-	+	-	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	-	-	v	+	+	v	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	v	+	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	+	v	+	+	-	+	+	+	v	-	-	-	-
<i>Enterobacter pyrinus</i>	v	v	-	+	+	-	+	+	-	v	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	v	v	v	v	-	+	-	+	-	+	(+)	-
<i>Hafnia alvei</i>	(-)	(+)	-	+	-	-	(-)	+	-	v	-	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Kluyvera</i> spp.	v	-	-	+	+	+	+	+	(+)	+	-	v	v	-
<i>Leclercia adecarboxylate</i>	-	-	-	-	v	v	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(-)
<i>Pontoea</i> spp.	-	v	-	-	v	v	v	+	v	v	-	v	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	v	(+)	-	-	-	v	v	-	-	-	+
<i>Providencia</i> spp.	-	-	-	-	v	-	-	-	v	+	v	-	-	v
<i>Rahnella aqualitis</i>	-	-	v	-	+	+	+	+	(-)	-	-	+	-	-
<i>Raoultella terrigena</i>	-	+	-	(-)	+	+	+	+	v	v	+	+	+	-
<i>Salmonella</i> sp.	-	-	v	(+)	-	-	v	(+)	v	+	-	v	(+)	v
<i>Serratia marcescens</i>	v	+	-	+	+	-	-	-	+	(-)	v	+	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	+	+	-	v	+	-	+	-	+	-	-

4-NP- α -Glc: 4-NP- α -Glukosid VP, Voges-Proskauer; ADH, arjinin dihidrolaz; ODC, ornitin dekarboksilaz; SAC sukrozdan asit; RAF, rafinozdan asit; CEL, sellobiyozdan asit; ARA, arabinozdan asit; CIT, sitrat kullanımı; ADO, adonitolden asit; SOR, sorbitolden asit; LDC, lisin dekarboksilaz; MR, metil red; H₂S, hidrojen sülfür oluşumu; +, % 90-100 pozitif; (+), % 80-90 pozitif; v, % 20-80 pozitif; (-), % 10-20 pozitif; -, <% 10 pozitif

Nazarowec-White ve Farber (1997b) tarafından, *Cronobacter* spp.'nin gelişme sıcaklığı beş klinik izolat, beş gıda izolatı ve standart suş kullanılarak araştırılmış ve maksimum gelişme sıcaklığının 41-45 °C, minimum gelişme sıcaklığının 5.5-8 °C arasında olduğu bildirilmiştir. Iversen vd. (2004a), altı klinik ve gıda suşunun 6-45 °C arasında geliştiğini ancak, optimum gelişme sıcaklığının 37-43 °C olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, bakterinin rekonstitüe bebek mamasında 8-47 °C'da geliştiği tespit edilmiştir (Kandhai vd. 2006). *Cronobacter* spp. için jenerasyon ve lag sürelerinin, diğer *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri için rapor edilen sürelerle yakın olduğu, fakat süt ürünlerinde bulunan diğer organizmalardan daha kısa olduğu belirlenmiştir. *Cronobacter* spp.'nin jenerasyon süresinin oda sıcaklığında 40 dakika olduğu bildirilmiştir *Cronobacter* spp.'nin bebek mamasındaki hızlı gelişiminin, yeni doğmuş bebeklerde hastaneden kaynaklanan ve patojenle ilgili enfeksiyonların nedeni olabileceği tahmin edilmektedir (Nazarowec-White ve Farber 1997b).

Cronobacter spp.'nin asit pH'ya önemli ölçüde direnç gösterdiği belirlenmiştir. Edelson-Mammel vd. (2006), HCl ile pH 3.0 ve 3.5'e ayarlanmış Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde 12 *Cronobacter* spp. izolatının canlı kalma düzeylerini incelemişlerdir. On iki suştan onunun 37 °C'da 5 saatten fazla bir sürede 1 logaritmik birimden az düşüş gösterdiği, pH 3.0'da TSB'deki indirgemenin 4.9->6.3 log kob/mL düzeyinde olduğu belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada *Cronobacter* spp.'nin üreyebildiği en düşük pH değerlerinin 37 °C'da pH 3.9-4.1 olduğu bildirilmiştir (Dancer vd. 2009). Skladal vd. (1993), 10-15 kob/500 mL düzeyinde *Cronobacter* spp. ile aşılınmış ve 30 °C'da inkübasyona bırakılmış sütün fermantasyonunu incelemişlerdir. Araştırmada pH, L-laktat ve D-laktat üretimindeki değişimler belirlenmiştir. *Cronobacter* spp.'nin sütü hızlı bir şekilde fermente edip, pH'yı 20 saatten az bir sürede 6.6'dan 5.6'ya düşürdüğü belirtilmiştir. L-laktat ve D-laktat yoğunluklarının sırasıyla, 0.40 mM ve 10.7 mM'a ulaştığı belirlenmiştir.

2.2 *Cronobacter* spp.'nin Kontaminasyon Kaynakları

Cronobacter spp.'nin doğal yaşam alanı bilinmemekle beraber, bakteri çevrede ve gıdalarda bulunabilmektedir. Yenidoğan bebeklerde görülen enfeksiyonlar sebebiyle

Cronobacter spp.'nin, bebek maması ve süt tozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak, bakteri gıdadan, çevreden ve farklı klinik kaynaklardan izole edilmiştir. *Cronobacter* spp.'nin temel çevresel kaynaklarının su, toprak ve sebzeler olduğu, ikincil bir kontaminasyon yolunun da sinekler ve kemirgenler gibi vektörler olabileceği belirtilmiştir (Iversen ve Forsythe 2003). *Cronobacter* spp.'nin Meksika'daki meyve sineği *Anastrepha ludens* ve ahır sineği *Stomoxys calcitrans*'dan izole edildiği bildirilmiştir. Özellikle *Stomoxys calcitrans* sineğinin dünyadaki yayılışı ile *Cronobacter* spp. enfeksiyonlarının rapor edildiği bölgeler arasında korelasyon olduğu belirtilmektedir. Bu durum *Cronobacter* spp.'nin çevresel kontaminasyonunda bu sineklerin de önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Kuzina vd. 2001, Hamilton vd. 2003, Gültekin ve Demirel 2006).

Cronobacter spp. serebrospinal sıvılar, kan, kemik iliği, balgam, idrar, bağırsak ve solunum sistemleri, göz, kulak, yaralar ve dışkı dâhil olmak üzere çok geniş klinik kaynaklardan izole edilmiştir. *Cronobacter* spp.'nin gıdalarda ve çevrede, klinik ortamlarda olduğundan daha yaygın olduğu belirtilmiştir. Organizma, peynir, süttozu, bebek mamaları, UHT süt, fermente edilmiş ekmek, tofu, ekşi çay, kürlenmiş et, dana kıyma, sosis eti, tahıllar, baharat ve sebzeler de dahil olmak üzere bir dizi gıdadan izole edilmiştir. Ayrıca fabrika ortamlarından, süttozu üretim tesislerinden, ev tipi elektrik süpürgesinden de sıklıkla izole edildiği bildirilmiştir. Elde edilen bulgular bakterinin her yerde bulunabilen dağılımını doğrulamaktadır. Engelleyici kontrol önlemleri tasarlanırken, *Cronobacter* spp.'nin geniş ölçüde yaygın doğasının da göz önünde bulundurulması tavsiye edilmektedir (Kuzina vd. 2001, Iversen ve Forsythe 2003, Iversen vd. 2004b, Kandhai vd. 2004a, Gurtler vd. 2005, Drudy vd. 2006, Craven vd. 2010, Reich vd. 2010).

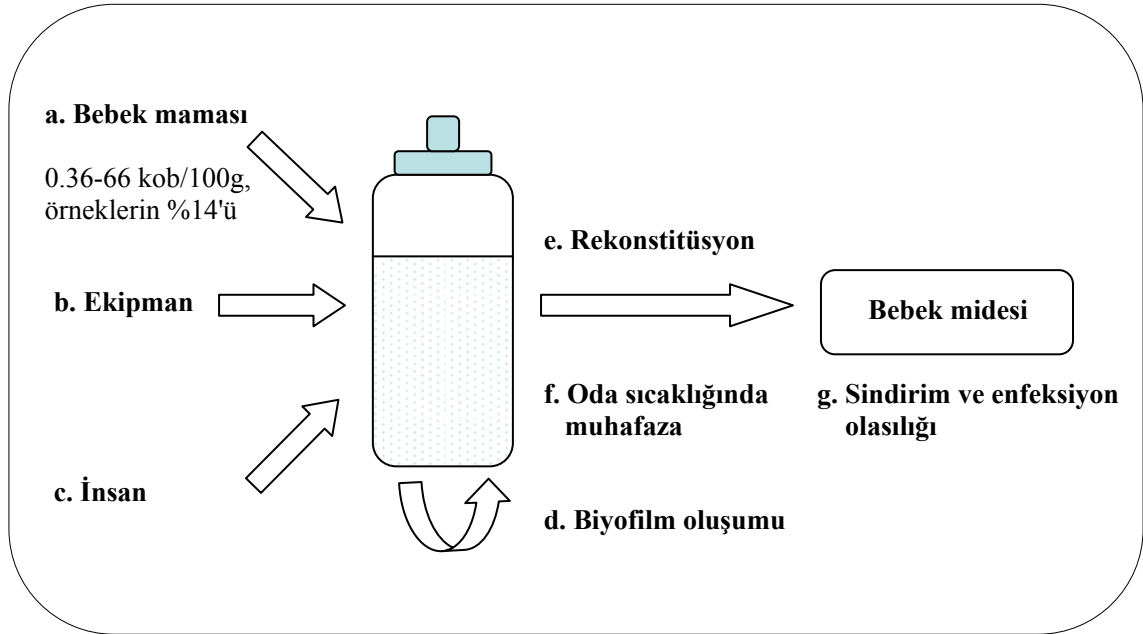
Bebek mamaları, ilk 4 veya 6 aya kadar bebeklerin besin ihtiyaçlarını karşılayabilen, normal büyüme ve gelişmeyi sağlamak amacıyla üretilen, bileşimi anne sütüne yakın olan; protein, yağ, karbohidrat, vitaminler, mineral maddeler ve katkı maddeleri ile teknolojisine uygun olarak hazırlanan ve ısıl işlemle dayanıklı hale getirilen ürünlerdir (Anonim 2009a). *Cronobacter* spp., pek çok gıdada tespit edilmiş olmasına rağmen, enfeksiyon ile güçlü bir ilişki sadece toz bebek mamasında bulunmuştur.

Bebek mamasının *Cronobacter* spp. ile kontaminasyonu, doğrudan ve dolaylı yoldan olabilir. Doğrudan kontaminasyon bakterinin, üretimin bir aşamasında bebek mamasına bulaşmasından kaynaklanmaktadır. Normal koşullarda *Cronobacter* spp.'nin toz bebek maması üretiminin pastörizasyon aşamasında canlı kalamadığı ancak ürünün pastörizasyon işlemi sonrasında vitamin, mineral, protein gibi ısıya duyarlı katkıların ve besin elementlerinin eklenmesi sırasında kontamine olabileceği belirtilmektedir. Ancak yapılan bir araştırmada bakterinin, üretimin ısıtma işlemi uygulanan sprey kurutma aşamasında canlı kalabildiği belirlenmiştir (Arku vd. 2008). Bu nedenle üretim sırasındaki yetersiz pastörizasyon da enfeksiyona neden olabilmektedir. Dolaylı kontaminasyon ise bebek mamasının hazırlanması sırasındaki yetersiz hijyenik koşullar ile blender ve kaşık gibi kirli mutfak araçlarının kullanımından kaynaklanabilmektedir (Drudy vd. 2006). Beş neonatal menenjit vakasından oluşan bir salgında, bebek mamasını hazırlamak için kullanılan bir karıştırma kaşığı ve bir tabak fırçasından ve hazırlanmış bebek mamasından *Cronobacter* spp. izole edilmiştir (Muytjens vd. 1983). Bakterinin lateks, polikarbonat, silikon, cam, polivinil klorür ve paslanmaz çelik yüzeylerde tutunarak geliştiği ve biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir (Iversen vd. 2004a, Kim vd. 2007). Şekil 2.1'de bebek maması tüketimi sırasındaki olası kontaminasyon kaynakları ve risk faktörleri gösterilmiştir (Forsythe 2005).

Bebek mamasında *Cronobacter* spp. varlığına yönelik çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Muytjens vd. (1988) 35 ülkeden 141 toz bebek maması örneğinin % 52.2'sinin *Enterobacteriaceae* ile kontamine olduğunu, bunlardan % 25'inin *E. agglomerans*, % 21'inin *E. cloacae* ve % 14'ünün *Cronobacter* spp. içerdiğini belirlemişlerdir. Kontaminasyon düzeyinin 0.36-66 kob/100 g arasında olduğu belirtilmiştir. Bu düzey, yenidoğan yoğun bakım ünitesindeki bir salgın sırasında kullanılmış olan açık bir toz mama kutusu için Simmons vd. (1989)'nin belirlediği 8 kob/100 g'lık değere yakındır.

Nazarowec-White ve Farber (1997b), Kanada'daki beş farklı markaya ait toplam 120 adet bebek mamasını test ederek bunlardan % 6.7'sinin *Cronobacter* spp. içerdiğini tespit etmişlerdir. Pozitif örneklerdeki *Cronobacter* spp. düzeylerinin sıklıkla 0.36-66 kob/100 g arasında olduğu belirtilmiştir. Heuvelink vd. (2001) tarafından toz bebek

maması ve süt tozu örneklerinde 25 g'da var/yok testi yapılmış, incelenen 170 süt tozu örneğinin 7'sinde ve 40 toz bebek mamasının 1'inde *Cronobacter* spp. belirlenmiştir (Gurtler vd. 2005).



Şekil 2.1 Bebek maması tüketimi sırasındaki olası kontaminasyon kaynakları ve risk faktörleri (Forsythe 2005)

a. Toz bebek mamasının kontaminasyonu, b. Rekonstitüsyon sırasında kullanılan kaşık gibi temiz olmayan ekipmanların kullanılması sonucu meydana gelen kontaminasyon, c. Rekonstitüsyon sırasında insanlar tarafından mamanın kontaminasyonu, d. Kontamine olmuş biberonun yetersiz temizlenmesi, e. Rekonstitüsyon sırasında kullanılan suyun sıcaklığı, f. Rekonstitüsyon sonrasında bakterinin oda sıcaklığında çoğalması, g. Bebeğin midesinde bakterinin canlılığını sürdürmesi ve olası çoğalması

Iversen ve Forsythe (2004b), 82 toz bebek maması örneğini ve 404 gıda ürününü *Cronobacter* spp., *Salmonella* ve *Enterobacteriaceae* varlığı açısından incelemişlerdir. Bakteri, 82 mamanın 2'sinden (% 2.4), 49 bebek gıdasının 5'inden (% 10.2), 72 süt tozunun 3'ünden (% 4.1), 62 peynir ürününün 2'sinden (% 3.2) ve 122 bitki ve baharatın 40'ını (% 37.8) kapsayan çeşitli kuru gıda maddelerinden izole edilmiştir. Bebek maması, bebek gıdası ve süttozu örneklerinden *Salmonella* izole edilmemiştir. Mama ve süttozunun, *Salmonella* kontrolü ile gözlem altında tutularak hijyenik üretiminin ve *Enterobacteriaceae* sayımının *Cronobacter* spp.'yi kontrol altına almadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan başka bir araştırmada 58 bebek maması örneğinin 8'inde (% 13.8) *Cronobacter* spp. belirlenmiştir (Leuschner vd. 2004). Shaker vd. (2007),

bebek maması, bebek gıdası, süt tozu, tahıl ürünleri, baharat, Şeker ve gıda üretim ortamları olmak üzere 106 örnekte *Cronobacter* spp. ve *Enterobacter* sp. varlığını araŐtırmıŐlardır. Bebek maması (2/8), bebek gıdası (2/15) ve tahıl rnlerinde (1/18) *Cronobacter* spp. saptanırken, süt tozu, Şeker ve çevresel örneklerde *Cronobacter* spp. belirlenmemiştir.

Bebek devam mamaları ve bebek gıdalarında *C. sakazakii* ve diğer *Cronobacter* türleri üzerine yapılan uluslararası bir araştırmada, 7 farklı ülkeden (Brezilya, Endonezya, İngiltere, İsrail, Kore, Malezya, Portekiz) toplam 290 örnek temin edilmiştir. Analize alınan devam mamalarının % 3 (3/91)'nde, bebek gıdalarının ise % 12 (24/199)'sinde *C. sakazakii* belirlenmiştir. Araştırma kapsamında devam mamalarından *C. sakazakii* dışında *Acinetobacter baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* ve *Serratia ficaria* izole edilmiştir (Chap vd. 2009). O'Brien vd. (2009a), devam mamaları ve ayrıca bebek içeceklerini içeren toplam 470 rneği *C. sakazakii* varlığı açısından incelemişlerdir. Araştırmacılar tarafından süt ve soya bazlı devam mamalarında *C. sakazakii* saptanmazken, incelenen iki tahıl bazlı bebek ieēinde *C. sakazakii* (0.003-0.013 EMS/g) tespit edilmiştir.

2.3 *Cronobacter* spp.'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar ve Patojenite

Cronobacter spp. enfeksiyonları bebeklerde hayati tehlike yaratan menenjit, septisemi ve nekrotizan enterokolit (NEC) vakalarının önemli bir sebebidir. Özellikle erken doğmuş (prematüre) ve düşük kilolu (<2.5 kg) bebekler ile 28 günden kk olan bebeklerin daha fazla risk altında olduğu belirtilmiştir. YetiŐkinlerde ise çok daha az sayıda *Cronobacter* spp. enfeksiyonu bildirilmiştir ve genellikle enfeksiyonun hayati tehlike yaratmadığı saptanmıştır (Nazarowec-White ve Farber 1997a, Iversen ve Forsythe 2003, Gurtler vd. 2005, Drudy vd. 2006). Bakteri, en çok yeni doğmuş bebekler ve 3 günlük ile 4 yaş arası çocuklarda hastalığa neden olarak kendini göstermiştir. Şimdiye kadar bebek ve çocuklarda yaklaşık 156 adet *Cronobacter* spp. enfeksiyonu vakası ve 29 adet ölüm (% 19) rapor edilmiştir (Kandhai 2010). Ancak, epidemiyolojik araŐtırmalarla doğrulann çalışmalar, bebek mamasının yanı sıra, hastane ortamlarında mamaların hazırlanması için kullanılan araç-gereçleri

kontaminasyon kaynağı olarak göstermiştir (Muytjens vd. 1983, Noriega vd. 1990). Urmenyi ve Franklin (1961) 1958 yılında İngiltere’de gerçekleşen, *Cronobacter* spp.’nin sebep olduğu ilk iki menenjit vakasını bildirmiştir. Ardından dünya çapında *Cronobacter* spp.’nin sebep olduğu menenjit, septisemi, nekrotizan enterokolit vakaları rapor edilmiştir (Çizelge 2.3). Raporların çoğunun hastane kreşleri ve neonatal yoğun bakım ünitelerinden olduğu bildirilmiştir. Prematüre bebeklerin ve medikal sağlık sorunları olan bebeklerin *Cronobacter* spp. enfeksiyonuna yakalanma riski daha yüksektir. Ancak, İzlanda’da sağlıklı, zamanında doğmuş bir bebeğin, hastaneden çıkarılmadan önce hasta olduğu ve *Cronobacter* spp. enfeksiyonunun kalıcı nörolojik bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir.

Yeni doğmuş bebeklerde enfeksiyon riskini arttırmaya katkıda bulunan faktörler, prematüre doğum ve düşük doğum ağırlığıdır. Bakterinin, yeni doğmuş bebeklerin üst gastrointestinal sistemlerinde düşük pH koşullarıyla karşılaşmayacağı ve hızla ince bağırsaklara geçerek enfeksiyona neden olabileceği belirtilmiştir (Iversen ve Forsythe 2003, Gurtler vd. 2005, Drudy vd. 2006). Van Acker vd. (2001), Belçika’da nekrotizan enterokolit görülen 12 bebeğin etkilendiği bir *Cronobacter* spp. salgını bildirmişlerdir. Bu salgında *Cronobacter* spp. toz bebek mamasından hazırlanan sıvı mamadan izole edilmiştir. Belçika’da 2002 yılında ticari olarak piyasa sürülmüş bir bebek maması tüketiminin ardından *Cronobacter* spp. kaynaklı menenjit nedeniyle bir bebek hayatını yitirmiştir. Hastalığın bulaştığı bebek mamasında düşük değerlerde *Cronobacter* spp. belirlenmesinin ardından ürün piyasadan toplatılmıştır. Haziran 2004’te Yeni Zelanda’da erken doğan bir bebekte *Cronobacter* spp. kaynaklı menenjit belirlenmiş ve ölümle sonuçlanmıştır. Bunun ardından yürütülen incelemede neonatal yoğun bakım ünitesinde diğer 4 bebeğin de bu organizmayı taşıdığını ortaya çıkarmış ancak bebeklerden hiçbirinin durumu kötüleşmemiştir. İnceleme sonunda, mikroorganizmanın kaynağının kullanılan bebek maması olduğu öne sürülmüştür (Drudy vd. 2006). Son olarak 2008 yılında ABD’nin New Mexico eyaletinde ve Japonya’da kayıtlara geçen *Cronobacter* spp. enfeksiyonları bildirilmiştir.

Çizelge 2.3 Dünya üzerindeki neonatal *Cronobacter* spp. salgınları (Kandhai 2010)

Yıl	Ülke	Vaka sayısı	Ölüm
1961	İngiltere	2	2
1965	Danimarka	1	
1979	ABD	1	
1981	ABD	2	
1983	Hollanda	8	6
1984	Yunanistan	1	
1985	ABD	1	
1987	Yunanistan	11	4
1988	ABD	2	
1989	Portekiz	1	1
1989	İzlanda	3	1
1989	ABD	4	
1990	ABD	1	
1991	ABD	1	
1994	Almanya	1	
1997	İskoçya	1	
2000	ABD	1	
2000	Brezilya	5	
2001	ABD	3	
2001	Belçika	12	2
2001	İsrail	2	
2002	İsrail	3	
2002	ABD	20	2
2002	Belçika	1	1
2003	Brezilya	1	
2003	Macaristan	1	
2003	ABD	5	
2004	ABD	2	
2004	Macaristan	1	
2004	Yeni Zelanda	5	1
2005	ABD	2	
2005	Macaristan	1	
2006	ABD	5	
2006	Macaristan	1	
2006	Fransa	9	2
2007	ABD	9	1
2007	Kanada	1	
2007	Hindistan	2	1
2007	İspanya	1	
2007	Fransa	18	4
2008	ABD	3	
2008	Japonya	1	
Toplam		156	29

Menenjit, neonatal *Cronobacter* spp. enfeksiyonlarında rapor edilen en sık görülen durumdur. *Cronobacter* spp. menenjiti için bebek ölüm oranı % 40-80 olup ölüm genellikle enfeksiyonun birkaç saati içinde gerçekleşmektedir. Hayatta kalanlar için süregelen sorunların nörolojik rahatsızlıklarla sonuçlanabildiği bildirilmiştir. Pek çok neonatal *Cronobacter* spp. menenjiti vakasının yeni doğmuş bebeklerde yaygın olarak görülen gastrointestinal bir hastalık olan nekrotizan enterokolitle bir ilişkisi olabileceği bildirilmiştir. Hastalık; yaklaşık % 2-5 oranında prematüre bebeği etkilerken, % 10-55'inde ölüme yol açmaktadır. Anne sütüyle beslenmiş bebeklere kıyasla, bebek mamasıyla beslenmiş bebeklerde nekrotizan enterokolitin 10 kat daha yaygın olduğu belirtilmiştir (Iversen ve Forsythe 2003, Gurtler vd. 2005, Drudy vd. 2006).

Cronobacter spp.'nin patojenik mekanizması ve potansiyel virülens faktörlerine ilişkin çok az bilgi bulunmaktadır. Pagotto vd. (2003) fare modelini kullanana kadar, *Cronobacter* spp.'nin minimum bulaşıcı dozunu, öldürücü dozunu veya virülensliğini belirli bir biçimde gösteren hiçbir hayvan modeli tanımlanmamıştır. Araştırmacılar, *Cronobacter* spp.'nin, ağız yoluyla veya intraperitoneal yolla aşılansmış fareler için patojenik olduğunu bulmuşlardır. Araştırmada kullanılan 18 *Cronobacter* spp. izolatından (9 klinik, 8 gıda ve 1 standart suş) 4'ünün enterotoksin ürettiği belirlenmiştir. Bazı suşların ise patojenik olmadıkları tespit edilmiştir. Son dönemde yapılan bir araştırmada ise *Cronobacter* türleri içerisinde yalnızca *C. sakazakii*, *C. malonaticus* ve *C. turicensis*'in neonatal enfeksiyonlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kucerova vd. 2010).

Bugüne kadar *Cronobacter* spp. enfeksiyonu saptanmış neonatal vakalarda bulaşıcı doz belirlenmemiştir. Enfeksiyon dozu ile ilgili yeterli düzeyde epidemiyolojik çalışmanın bulunmamasına karşın bakterinin enfeksiyon oluşturması için gerekli hücre sayısının *Neisseria meningitidis*, *E. coli* O157 ve *L. monocytogenes* 4b gibi patojen bakteriler ile benzerlik göstereceği tahmin edilmektedir. Enfektif doz, organizmanın geçmişi, konakçının durumu ve gıda matrisine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Iversen ve Forsythe 2003).

2.4 İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri

Cronobacter spp.'nin bebek mamalarındaki kontaminasyon düzeyinin (0.36-66 kob/100 g) oldukça düşük olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle *Cronobacter* spp. tespitine yönelik mevcut yöntemlerde bakterinin geri kazanım oranını artırmak için zenginleştirme işlemi uygulanmaktadır. *Cronobacter* spp.'nin toz bebek mamasından izolasyonu ve sayımı için uygulanan kültürel belirleme yöntemlerinden biri olan FDA metodu *Cronobacter* spp.'nin sarı pigment üretimine dayalıdır (Anonymous 2002). Yöntem, toplam 333 g ürünü (3x100 g, 3x10 g, 3x1 g) analize alan En Muhtemel Sayı (EMS) yaklaşımına dayanmaktadır. İşlem, steril saf su ile ön zenginleştirme, *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth besiyerinde selektif zenginleştirme ve Violet Red Bile Glucose Agarda (VRBG) izolasyon aşamalarını kapsar. VRBG Agardan 5 adet olası *Cronobacter* spp. kolonisi seçilir ve Tryptic Soy Agarda 25 °C'da 48-72 saat inkübasyon sonunda sarı pigment üretimi belirlenir. Bunu takiben izolatlar API 20E biyokimyasal identifikasyon sistemi ve oksidaz testi kullanılarak doğrulanır (Şekil 2.2). Ancak bu protokol yalnızca *Enterobacteriaceae* için seçici olup, *Cronobacter* spp. için belirleyici değildir. Ayrıca protokolün tamamlanması için 5 günlük bir süre gerekmektedir. Heuvelink vd. (2001), *Cronobacter* spp. tespitinde ön zenginleştirme besiyeri olarak Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) kullanarak 25 g bebek maması örneğini var/yok yöntemiyle analiz etmişlerdir (Gurtler vd. 2005).

Toz bebek mamalarında *Cronobacter* spp.'nin belirlenmesinde FDA tarafından önerilen metodun uzun sürmesi ve izolasyonda kullanılan besiyerinin (VRBG Agar) bakteri için seçici ve ayırt edici olmaması nedeniyle son yıllardaki çalışmalarda *Cronobacter* spp. izolasyonu için kromojenik substratlar içeren besiyeri formülasyonları geliştirilmiştir. *Cronobacter* spp. izolasyonu için geliştirilen kromojenik besiyerleri *Cronobacter* spp.'nin sahip olduğu α -glucosidase aktivitesine dayalıdır. Bu özellik bakteriyi izole etmek için geliştirilmiş besiyerlerinde diferansiyel reaksiyon için temel oluşturmaktadır. Yeni geliştirilen besiyeri formülasyonlarında kromojenik substrat olarak 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranoside (X α Glc) (Iversen vd. 2004c), 4-methylumbelliferyl α -D-glucopyranoside (MU α Glc) (Leuschner vd. 2004, Oh ve Kang 2004), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-cellobioside (Restaino vd. 2006)

kullanılmaktadır. *Cronobacter* spp., α -glucosidase enzimi ile bu substratları hidrolize ederek farklı renklerde koloni oluşmasını sağlamakta ve 365 nm uzun dalga boylu ultraviyole ışık altında floresan ışımaya veren ürünlere dönüştürmektedir.

Cronobacter spp. izolasyonu için X α Glc içeren besiyerlerinden en yaygın kullanılanları Druggan-Forsythe-Iversen Agar (DFI Agar) ve *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar (ESIA)'dır. Kromojenik bir substrat olan X α Glc, α -glucosidase enzimi ile aglikon ve bromo-4-chloro-3-indolyl'e parçalanır ve oluşan ürünlerden bromo-4-chloro-3-indolyl, oksijen varlığında bir pigment olan bromo-chloro-indigo'ya dönüşür. Bu pigment sayesinde *Cronobacter* spp. besiyerinde mavi-yeşil renkli koloniler oluşturur. α -glukozidaz aktivitesi yalnızca *Cronobacter* spp. ile sınırlı değildir. DFI agarda ESIA besiyerinden farklı olarak besiyerinde hidrojen sülfür üretimi belirlenebilmekte böylece zayıf α -glucosidase aktivitesine sahip olan *Proteus* türlerinin ayrımı mümkün olmaktadır (Iversen vd. 2004c).

Iversen vd. (2004c), *Cronobacter* spp.'nin 95 adet klinik ve gıda izolatu üzerine yaptıkları çalışmalarında, DFI Agar kullanılarak izlenen yöntemin FDA yöntemine kıyasla daha kısa zamanda sonuç verdiğini göstermişlerdir.

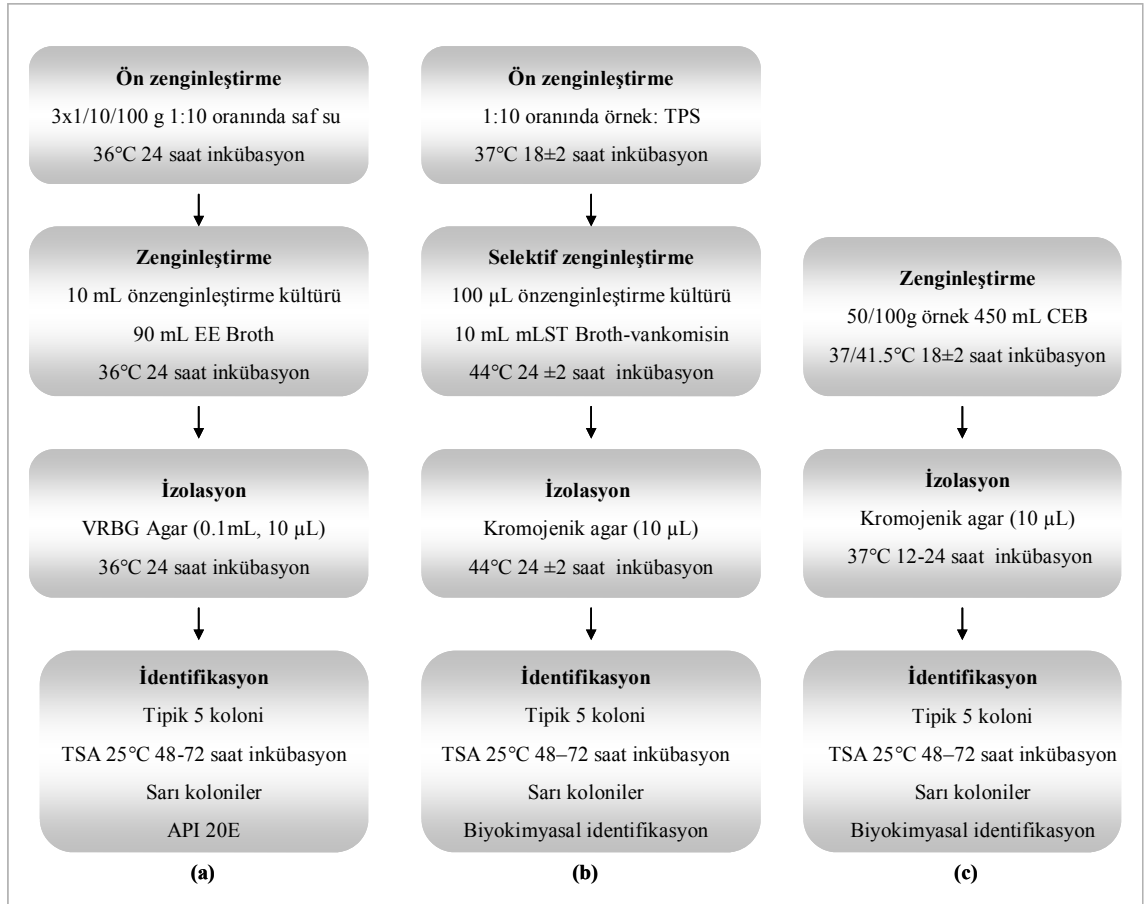
Leuschner vd. (2004) tarafından, bebek mamasında *Cronobacter* spp.'nin belirlenmesi için bir besiyeri geliştirilmiştir. Bu besiyeri, *Cronobacter* spp.'yi *Enterobacteriaceae* familyasındaki diğer türlerden ayıran α -glukosidaz enzim aktivitesi üzerine kurulmuştur. *Cronobacter* spp., 4-methylumbelliferyl α -D-glucoside (α -MUG) eklenmiş Nutrient Agarda UV ışığı altında floresan ışımaya veren sarı koloniler oluşturmaktadır. Bebek mamalarından izole edilmiş olan *Acinetobacter* sp., *Escherichia hermannii*, *Cedaceae lepagii*, *Leclercia acecarboxylata* ve *E. agglomerans* da sarı pigment üretmiş, fakat koloniler UV ışığı altında floresan ışımaya vermemiştir. Besiyeri, toz bebek mamasında *Cronobacter* spp. tespit etmek için tasarlanmış laboratuvarlar arası bir çalışmada iyi performans göstermiştir. Başka bir çalışmada, α -MUG içeren kromojenik besiyerinin *Cronobacter* spp.'nin ayırt edilmesi ve izolasyonu için güvenilir olduğu gösterilmiştir (Oh ve Kang 2004, 2005).

Kandhai vd. (2004b), Tryptic Soy Agar besiyerinde sarı pigmentli hücreler tarafından α -glucosidaz üretimine dayalı bir kolorimetrik analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Koloni, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside içeren ortamda çözülmüş, 37 °C'da inkübasyona bırakılmış ve sarı renkli p-nitrophenyl hidrolizat oluşumu spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Bu yöntemle üç süt tozu üretim fabrikasından toplanan 152 çevresel örneğin 18'inden *Cronobacter* spp. izole edilmiştir.

ISO (International Organization for Standardization) ve IDF (International Dairy Federation) tarafından 2006 yılında süt ve süt ürünlerinde *Cronobacter* spp.'nin belirlenmesine yönelik standart bir analiz yöntemi yayınlanmıştır (Anonymous 2006). Yöntemi FDA yönteminden ayıran en önemli özellik, izolasyonda *Cronobacter* spp. için belirleyici olan kromojenik besiyerinin kullanımınıdır. Bu yöntemde ön zenginleştirme Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS)'da, selektif zenginleştirme modifiye Lauryl Sulfate Broth (mLST; vankomisin katkılı LST)'da ve izolasyon kromojenik katı besiyerinde (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) gerçekleştirilmektedir. Kromojenik besiyerinde gelişen tipik kolonilerin doğrulanması için öncelikle sarı pigment oluşumu belirlenmekte ve diğer biyokimyasal testler yapılmaktadır (Şekil 2.2).

Son yıllarda *Cronobacter* spp. izolasyonunda varolan yöntemlere alternatif daha hızlı, etkin ve güvenilir yöntem arayışına gidilmiş ve bu konuda araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. O'Brien vd. (2009b), bebek mamalarından *Cronobacter* spp. izolasyonunda ön zenginleştirme ve zenginleştirme aşamalarının kombine edildiği tek bir zenginleştirme (*Cronobacter* Enrichment Broth, CEB) ve izolasyon (ChromID Sakazakii) aşamalarından oluşan yeni bir protokol geliştirmişlerdir (Şekil 2.2). Tek aşamalı zenginleştirme işleminin uygulandığı bu yeni protokol ile standart kültürel yöntemlere göre analiz süresinin 2 gün kısaldığı bildirilmiştir. Aynı zamanda protokolda zenginleştirme besiyeri olarak kullanılan *Cronobacter* Enrichment Broth'un performansının *Cronobacter* spp. izolasyonunda kullanılan diğer zenginleştirme besiyerlerine kıyasla daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Daha önce yapılan araştırmalarda bazı *Cronobacter* türlerinin modifiye Lauryl Sulfate Broth ve *Enterobacteriaceae* Enrichment Broth besiyerlerinde gelişmediği bildirilmiştir (Lehner vd. 2006, Iversen ve Forsythe 2007). *Cronobacter* spp. tespiti amacıyla çok sayıda zenginleştirme ve

izolasyon besiyerleri geliştirilmiş ve bunların karşılaştırmaları üzerine araştırmalar yapılmıştır. Son dönemde *Cronobacter* spp.'nin tespiti için formüle edilen besiyerlerine örnek olarak Kim-Rhee (KR) Agar ve Al-Holy-Rasco (AR) Broth verilebilir. Formüle edilen bu besiyerlerinden Kim-Rhee (KR) Agar'ın *Cronobacter* spp. izolasyonunda yüksek özgüllük (% 98) ve duyarlılığa (% 100) sahip olduğu belirtilmiştir (Al-Holy vd. 2011, Kim ve Rhee 2011).



Şekil 2.2 *Cronobacter* spp. tespitinde kullanılan protokoller (Healy vd. 2010)

a. FDA, b. ISO/TS 22964, c. O'Brien vd. 2009b

Patojenlerin analizinde kullanılan klasik yöntemlerin analiz sürelerinin uzunluğu önemli bir dezavantajdır. Moleküler teknikler, bakterilerin tanımlanması, karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında büyük öneme sahiptir. Bu nedenle patojen mikroorganizmaların tespitinde son yıllarda DNA'ya dayalı teknikler oldukça önem kazanmış ve özellikle

PCR tekniği klasik yöntemlerin yerini alabilecek hızlı ve duyarlı alternatif bir metot olarak öne çıkmıştır.

Son yıllarda *Cronobacter* spp.'nin genetik tiplendirme çalışmalarında tüm gen bölgelerinin analizine imkân sağlayan, sınıflandırma ve karakterizasyonda oldukça hızlı bir yöntem olan PCR temelli teknikler kullanılmaktadır. Ribozomal 16S rRNA geni, 16S ve 23S rRNA genleri arasında yer alan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi ile *thdF*, *rpoA*, *rpoB*, *ompA*, *recN* ve *gluA* gibi hedef genler *Cronobacter* spp. tanımlamasında kullanılan genlerdir (Lehner vd. 2006, Liu vd. 2006, Mohan Nair ve Venkitarayanan 2006, Hassan vd. 2007, Healy vd. 2008, Iversen vd. 2008, Krascenicsova ve Trncikova 2008, Zhou vd. 2008, El-Sharoud vd. 2009, Kuhnert vd. 2009, Stoop vd. 2009).

Seo ve Brackett (2005), real-time PCR ile *Cronobacter* spp.'nin makro-moleküler (MMS) operon sentezini hedefleyen primerler ve TaqMan prob kullanarak, sulandırılmış bebek mamalarında *Cronobacter* spp.'yi zenginleştirme işlemi yapılmaksızın 100 kob/mL, 24 saat zenginleştirme sonrasında ise 0.6 kob/mL düzeyinde belirleyebilmişlerdir. 16S-23S rDNA genini kodlayan “internal transcrib spacer” gen bölgelerinin hedef alınarak yapılan başka bir araştırmada, TaqMan Prob ve Sybr Green olmak üzere iki farklı real-time PCR tekniği ile *Cronobacter* spp. toz bebek maması örneklerinde 1.1 kob/100 g seviyesinde tespit edilebilmiştir (Liu vd. 2006). Gutierrez-Rojo ve Torres-Chavollo (2007) tarafından yapılan araştırmada, direkt PCR yöntemi ile 10⁵ kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. tespit edilirken, 8 saatlik selektif zenginleştirme ile yapılan PCR sonucunda 1 kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. saptanmıştır. Mohan Nair ve Venkitanarayanan (2006), araştırmalarında bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile 10³ kob/mL düzeyinde ve 8 saatlik zenginleştirme sonrasında 0.1 kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. belirlemişlerdir.

Chen vd. (2009), standart FDA yöntemini revize ederek bebek mamalarından *C. sakazakii*'nin tespitinde kromojenik agar ve real-time PCR sisteminin kombine edildiği yeni bir protokol geliştirmişlerdir. Revize edilen yöntemin standart yöntemle göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir.

Cronobacter spp.'nin belirlenmesinde ticari üç farklı real-time PCR sisteminin (BAX® System PCR Assay *Enterobacter sakazakii*, Assurance GDS™ *Enterobacter sakazakii*, Foodproof® *Enterobacter sakazakii* Detection Kit) karşılaştırıldığı bir çalışmada, Foodproof® *Enterobacter sakazakii* Detection Kit ve Assurance GDS™ *Enterobacter sakazakii* sistemlerinin özgüllüğü % 100 olarak belirlenmiştir (Feer vd. 2011).

Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen *Cronobacter* spp.'nin karakterizasyonunda PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), MLST (Multi Locus Sequence Typing) ya da ribotyping yöntemleri de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çetinkaya (2011) çeşitli gıdalardan (tahıl unları, bitki çayları ve hayvansal gıdalar) izole edilen 54 adet *Enterobacter* spp. ve *Cronobacter* spp. izolatlarının tür düzeyinde belirlenmesinde uygun olan moleküler tiplendirme yöntemini belirlemek amacıyla yaptığı araştırmada, PFGE, MLST, PCR bazlı 16S rRNA dizi analizi ve MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) tekniklerini karşılaştırmıştır. Araştırma sonucunda PFGE yöntemi ile daha kısa bir sürede sonuç alındığı, MLST ve 16S rRNA dizi analizi yöntemlerinin ise suşların tanımlanmasında daha etkili olduğu tespit edilmiştir. PFGE, yüksek ayırım gücü ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliklerinden dolayı moleküler tiplendirme yöntemleri arasında altın standart olarak ifade edilmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu 2011). Mullane vd. (2007) bebek maması üretim tesisinde *Cronobacter* varlığı üzerine yaptıkları araştırmalarında PFGE yöntemi kullanmışlardır. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) yöntemi de, bakteri tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Almeida vd. (2009) tarafından FISH yöntemi kullanarak *Cronobacter* spp.'nin hızlı tespitine yönelik yapılan araştırmada, 8 saatlik zenginleştirme ile toz bebek mamasında 1 kob/10 g düzeyinde hedef bakteri tespit edilirken, yöntemin özgüllüğü ve duyarlılığının % 100 olduğu belirlenmiştir.

2.5 Termal Direnç, Ozmotik Ortam ve Depolama Koşullarında Direnç

Cronobacter spp. termal direnci bir dizi araştırma ile belirlenmiştir. Termal direnç konusunda önemli farklılıklar gözlenirse de, *Cronobacter* spp.'nin süt ürünlerinde diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden daha yüksek termal dirence sahip olduğu görülmüştür. Termal dirençte görülen bu değişikliklerin *Cronobacter* spp.'nin genetik farklılıklarıyla ilişkili olup olmadığı henüz ortaya konulamamıştır (Nazarowec-White ve Farber 1997c, Breeuwer vd. 2003, Edelson-Mammel ve Buchanan 2004, Iversen vd. 2004a, Shaker vd. 2008, Al-Holy vd. 2009, Osaili vd. 2009).

Nazarowec-White ve Farber (1997c), sulandırılmış toz bebek mamasındaki *Cronobacter* spp.'nin termal inaktivasyon ve direnç özelliklerini bebek mamasında belirlemişlerdir. 7 log kob/mL popülasyonda 5 gıda ve 5 klinik izolatu olmak üzere 10 *Cronobacter* spp. izolatu 52, 54, 56, 58 ve 60 °C'da ısıtılmıştır. Sonuçta elde edilen *D* değerleri 5.82 °C'lık bir *z* değeriyle birlikte sırasıyla 54.8, 23.7, 10.3, 4.20 ve 2.50 dakika olarak bulunmuştur. Buna göre, 6-7 log düzeyinde bir azalmanın sağlanabilmesi için 60 °C'da 15-17.5 dakika ısıtılmalıdır. Breeuwer vd. (2003) ise durağan evredeki 5 adet *Cronobacter* spp. suşunun 58 °C'daki *D* değerlerinin, 0.48 dakikalık bir ortalama ile 0.30 ile 0.60 dakika arasında olduğu bildirilmiştir. Diğer çalışmalarda *Cronobacter* spp.'nin sulandırılmış bebek mamasındaki termal direnci test edilmişken, bu çalışmada disodyum hidrojen fosfat/potasyum dihidrojen fosfat tamponu kullanılmıştır. Isıtma ortamı bileşiminin *D* değerleri üzerinde etkili olduğu, bebek mamasındaki yağ, protein ve karbohidrat içeriğinin *Cronobacter* spp.'yi termal inaktivasyondan koruyabileceği, dolayısıyla daha yüksek *D* değerlerinin elde edileceği sonucuna varılmıştır.

Iversen vd. (2004a) sulandırılmış toz bebek maması içindeki *Cronobacter* spp. için *D* değerlerini araştırmışlar ve standart suş için, 54, 56, 58 60 ve 62 °C'da sırasıyla 16.4, 5.1, 2.6, 1.1 ve 0.3 dakikalık *D* değerleri bildirmişlerdir. Bebek mamasının yüksek sıcaklıkta kısa süreli (HTST) pastörizasyonu (71.7 °C'da 15 saniye) ile *Cronobacter* spp. hücreleri inaktive edilebildiği belirtilmiştir.

Edelson-Mammel ve Buchanan (2004) tarafından 12 *Cronobacter* spp. suşunun termal direncinin incelendiği araştırmada, sulandırılmış bebek maması yaklaşık 8 log kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. ile aşılabilir ve 56, 58, 60, 65 ve 70 °C'da ısı işlem uygulanmıştır. İzolatlar arasında termal dirençlilik açısından yaklaşık 20 kata varan farklar olduğu belirlenmiştir. *C. muytjensii* ATCC 51329 (eski adı ile *E. sakazakii* ATCC 51329)'un en düşük termal dirence sahip suş olduğu, en yüksek termal dirence sahip suşun ise klinik bir izolat olduğu saptanmıştır.

Farklı stres koşullarının (soğutma, ısıtma, kurutma, besin yetersizliği) *Cronobacter* spp. suşlarının termal inaktivasyonuna etkisi konulu araştırmada, kurutma ve sıcaklık stres koşullarının *D* değerlerinde önemli bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Stres koşulları uygulanmamış *Cronobacter* spp. suşlarının 52, 54, 56 ve 58 °C'da *D* değerlerinin sırasıyla 15.33, 4.53, 2.00 ve 0.53 dakika olduğu belirlenmiştir (Shaker vd. 2008).

Osaili vd. (2009), süt ve özel amaçlı bebek formüllerinde *Cronobacter* türlerinin termal dirençlerini belirlemişlerdir. *Cronobacter* türlerinin 52 ve 58 °C'da *D* değerlerinin yağlı sütte (22.20-0.68 dakika), yağsız süt (15.87-0.62 dakika) ve düşük yağlı süte (15.30-0.51 dakika) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde laktoz içermeyen bebek formüllerinin (19.57-0.66 dakika), soya proteini içeren bebek formüllerine (17.22-0.63 dakika) göre daha yüksek *D* değerlerine sahip olduğu saptanmıştır. *z* değerlerinin ise süt ve bebek formülleri için 4.01-4.39 °C aralığında olduğu belirlenmiştir.

Cronobacter spp. ozmotik ortam ve kurutma gibi stres koşullarına diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine kıyasla daha dirençlidir ve düşük su aktivitesine (a_w) sahip olan toz bebek mamasında (0.25-0.5 a_w) uzun süre canlılığını korumaktadır (Breeuwer vd. 2003, Edelson-Mammel vd. 2005, Barron ve Forsythe 2007, Osaili ve Forsythe 2009).

Oda sıcaklığında depolanmış toz bebek mamasındaki *Cronobacter* spp. canlılığının incelendiği bir araştırmada, 6 kob/g düzeyinde *Cronobacter* spp. içeren toz bebek

maması 2 yıl süre ile depolanmıştır. Depolamanın ilk 5 ayında popülasyonun 2.4 log azaldığı, bu süreyi takip eden 19 ay boyunca popülasyonun 1 log daha azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, *Cronobacter* spp.'nin toz bebek mamasında uzun süre canlı kalabileceğini göstermektedir. Bakterinin bu gibi koşullar altında 2 yıla yakın bir süre boyunca yaşamını sürdürmesinin, kapsül oluşumuna bağlanabileceği öne sürülmüştür (Edelson-Mammel vd. 2005). Caubilla-Barron vd. (2004) ise, *Cronobacter* spp.'nin 9 klinik ve 1 gıda izolatının toz bebek mamasında canlılık düzeyini inceledikleri çalışmalarında depolamanın ilk 6 ayı içinde 2-4 log düzeyinde, depolamanın sonunda ise 4-7 log düzeyinde bir azalma olduğunu belirlemişlerdir (Gurtler vd. 2005).

Lin ve Beuchat (2007) ve Gurtler ve Beuchat (2007) su aktivitesi ve depolama sıcaklığının *Cronobacter* spp.'nin bebek tahılları (0.3-0.69 a_w) ve bebek mamalarında (0.25-0.5 a_w) canlı kalma düzeyine etkisi üzerine yaptıkları araştırmalarında, bakterinin 4 °C'da 21 °C ve 30 °C'da depolanan örneklerle kıyasla daha uzun süre canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Su aktivitesi ve depolama sıcaklığındaki artışın *Cronobacter* spp.'nin ölüm oranını artırdığı bildirilmiştir.

2.6 Antibiyotiklere Karşı Dirençlilik

Bakteriyel menenjit etkili bir tedavi gerektirdiği için, neonatal *Cronobacter* spp. enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılığı büyük önem taşımaktadır. *Cronobacter* spp.'nin, aminoglikozitler, üreidopenisilinler, ampisilin ve karboksipenisilinlere karşı tipik duyarlılık göstermekle beraber, bazı antibiyotiklere karşı diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden daha duyarlıdır. *Cronobacter* spp. tüm makrolidlere, linkomisin, klindamisin, streptogramin, rifampisin, fusidik asit ve fosfomisine karşı doğal direnç göstermektedir. Tetrasiklin, aminoglikozit, birçok β -laktam, kloramfenikol, antifolat ve kinolonun da içinde bulunduğu bazı antibiyotiklere karşı duyarlılık göstermektedir. *Cronobacter* spp. enfeksiyonları geleneksel olarak ampisilin-gentamisin ya da ampisilin-kloramfenikol ile tedavi edilmektedir (Lai 2001, Weir 2002, Gurtler vd. 2005, Drudy vd. 2006).

Farmer vd. (1980), test edilen *Cronobacter* spp. suşlarının gentamisin, kanamisin, kloramfenikol ve ampisiline duyarlı olduğunu; % 87'si veya daha fazlasının nalidiksik asit, streptomisin, tetrasiklin ve karbenisiline duyarlı olduğunu; % 71 ve % 67'sinin sırasıyla sülfadiazin ve kolitsine; yalnızca % 13'ünün sefalotine duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Tüm suşların penisiline dirençli olduğu, test edilen 100'den fazla suştan yalnızca birinin çoklu-antibiyotik direnci olduğu görülmüştür.

Muytjens vd. (1986), 25 antibiyotiğe karşı test edilen 195 *Cronobacter* spp. izolatının % 90'ı için MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) değerlerinin *E. cloacae* için belirlenen değerlerden en az iki kat daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Nazarowec-White ve Farber (1999), gıda suşlarından 5/8'inin, klinik suşlardan da 8/9'unun yalnızca sülfisoksazol ve sefalotine karşı dirençli olduğu belirlemişlerdir. Diğer klinik suşun tüm ajanlara karşı duyarlılık gösterdiği, diğer üç gıda izolatının ise kloramfenikole dirençli olduğu saptanmıştır.

Kuzina vd. (2001), Meksika meyve sineklerinin bağırsaklarından izole edilen *Cronobacter* spp.'nin ampisilin, sefalotin, eritromisin, novobiyosin ve penisiline karşı dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Muytjens vd. (1983), araştırdıkları vakalardaki *Cronobacter* spp. izolatlarının in vitro testlerde ampisilin, gentamisin, kloramfenikol ve kanamisine duyarlılık göstermesine rağmen, sekiz hastadan altısının yetersiz cevap verdiği ve öldüğünü rapor etmişlerdir.

2.7 *Cronobacter* spp. İnaktivasyonu

Son yıllarda tüketicilerin sentetik katkı maddeleri ile ilgili önyargıları ve katkı maddesi içermeyen ürünlere yönelik artan tüketici talepleri nedeniyle gıda muhafaza yöntemlerinde yeni teknikler ve özellikle doğal antimikrobiyel bileşiklere olan ilgiyi artırmıştır. *Cronobacter* spp. inaktivasyonunda da özellikle doğal antimikrobiyel bileşiklerin kullanımı önem kazanmıştır.

Bebek mamalarında *Cronobacter* spp. inaktivasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, anne ve inek sütünde doğal olarak bulunan kaprilik asidin monogliserit esterinin

(monokaprilin) sulandırılmış bebek mamalarında *Cronobacter* spp. üzerine antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Araştırmada, 0.25 mM ve 50 mM monokaprilin içeren 10 mL sulandırılmış bebek mamaları 6 log kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. ile aşılansın ve 4, 8, 23 ve 37 °C sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulmuş ve inkübasyonun 0., 1., 6., 24. ve 48. saatlerinde canlılık düzeyleri belirlenmiştir. 50 mM monokaprilin içeren bebek mamalarında 23 ve 37 °C’da inkübasyonun 1. saatinde *Cronobacter* spp. popülasyonunda >5 log kob/mL düzeyinde indirgeme sağlanmıştır. Araştırma sonunda monokaprilin, sulandırılmış bebek mamalarında *Cronobacter* spp. inaktivasyonunda potansiyel olarak kullanılabilereği ancak duyuşal çalışmalar ile bu uygulamanın desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Nair vd. 2004). Bebek mamalarında *Cronobacter* spp. inhibisyonu amacıyla farklı konsantrasyonlarda kaprilik asidin (5, 10, 20 ve 30 mM) düşük ısı işlem (45, 50 ve 55 °C) ile kombine edildiği bir araştırmada, uygulanan kombine sistemin sinerjistik etki ile sıcaklık ve kaprilik asit konsantrasyonundaki artışa da bağılı olarak *Cronobacter* spp. sayısında hızlı bir indirgeme sağladığı bildirilmiştir (Jang ve Rhee 2009). Kim vd. (2009) misket üzümü ekstraktının *Cronobacter* spp. üzerine antibakteriyel etkisini incelemişler ve ekstraktın içerdiği fenolik bileşiklerin, malik asit, tartarik asit ve tannik asidin *Cronobacter* spp.’ye karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini ve 1 saat içerisinde 6 log kob/mL düzeyinde indirgeme sağladığını belirlemişlerdir.

Amalaradjou ve Venkitanarayanan (2009) FDA tarafından GRAS olarak kabul edilen ve tarçın kabuğundan elde edilen trans-sinmaldehit ile yaptıkları araştırmalarında, % 0.5 konsantrasyonda trans-sinmaldehitin *Cronobacter* spp.’yi 23 ve 37 °C’da 4 saatte, 4 ve 8 °C’da 10 saatte saptanabilir düzeyin altına indirgediğini ve bebek mamalarında potansiyel olarak kullanılabilereğini ancak trans-sinmaldehitin gıdalarda duyuşal değıişimlere neden olup olmadığının araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir. Propiyonik ve asetik asit gibi organik asitlerin ise *Cronobacter* spp.’nin inaktivasyonunda etkili olduğu ve koruyucu amaçla kullanabileceği rapor edilmiştir (Back vd. 2009). Bebek mamalarında laktoperoksidaz uygulamasının *Cronobacter* spp.’yi hem inaktive edici hem de gelişimi önleyici etkisi olduğu tespit edilmiştir (Gurtler ve Beuchat 2007, Beuchat vd. 2009). Lee ve Jin (2008) tarafından farklı organik bileşikler (karvakrol, timol, eugenol, diasetil, sinnamik asid) üzerine yaptıkları araştırmada, karvakrol ve

timolün *Cronobacter* spp.'ye karşı en güçlü inhibisyon etki gösteren bileşikler olduğu belirlenmiştir.

Gıdaların ışınlanması ürün kalitesini ve güvenliğini koruyan fiziksel bir yöntem olarak kullanılmaktadır. 10 kGy'lik bir ışınlama ile ürünün besinsel, duyuşal ve toksikolojik herhangi bir değişikliğe neden olmadan saprofit ve patojen mikroorganizmalar elemine edilebildiği bildirilmiştir (Osaili ve Forsythe 2009). İyonize gama ışını kullanarak toz bebek mamalarında *Cronobacter* spp. inaktivasyonu üzerine de araştırmalar yapılmaktadır (Lee vd. 2007, Hong vd. 2008, Osaili vd. 2008a). Düşük dozda gama ışınlama işleminin (5 kGy) *Cronobacter* spp.'yi (8-9 log kob/g) tamamen inaktive ettiği ve bakterinin ışınlanan mamalarda rekonstitüsyon sonrasında 10 °C'da 6 saat depolama boyunca gelişmediği belirtilmiştir (Lee vd. 2007).

Elektromanyetik radyasyonun (2450 MHz) *Cronobacter* spp. inaktivasyonu üzerine yapılan bir araştırmada, test bakterileri 5 log kob/mL'lik bir popülasyonda sulandırılmış beş farklı toz bebek mamasına aşılınmış ve mamalar ilk kaynama belirtilerine kadar mikrodalga fırında ısıtılıp, ardından soğutulmuştur. Beş örnekten dördünün *Cronobacter* spp. için negatif sonuç verdiği, bir mama örneğinin ise 20 kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. içerdiği saptanmıştır. Mama bileşimlerindeki farklılıkların, *Cronobacter* spp.'nin farklı inaktivasyon oranlarının nedeni olabileceği belirtilmiştir. Bebek mamasının biberonlarda 82-93 °C'da 85-100 saniye boyunca mikrodalgada ısıtılmasının, *Cronobacter* spp. sayısında >4 log kob/mL'lik bir indirgeme sağlayabileceği bildirilmiştir. Mikrodalga uygulamasının, sağladığı ısı işlem etkisi nedeniyle, sulandırılmış bebek mamasının yeniden ısıtılmasında geleneksel yöntemlerin yerine mikrodalga kullanılması tavsiye edilmiştir (Kindle vd. 1996).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bebek maması, bebek ek gıdası ve bileşen örnekleri

Araştırmada materyal olarak, 100 adet bebek maması (başlangıç, devam), 40 adet bebek ek gıdası (tahıllı, meyveli, sebze, karışık), 60 adet bebek maması ve ek gıda bileşeni (süttozu, peyniraltı suyu tozu, ıspanak, brokoli, kabak, pırasa, havuç, patates, portakal, armut, elma ve muz parçacıkları (flake), elma tozu, muz tozu, buğday irmiği, arpa unu, akdarı unu, yulaf unu, darı unu, mısır irmiği, buğday unu, pirinç unu, çavdar unu) olmak üzere toplam 200 örnek kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan materyaller Ankara ve çevresindeki market ve üretim yerlerinden temin edilmiştir.

3.1.2 Bakteri kültürü

Bu çalışmada kontrol bakteri kültürü olarak kullanılan *C. muytjensii* ATCC 51329 (eski adı ile *E. sakazakii* ATCC 51329) liyofilize olarak sağlanmıştır (MicroBiologics, USA). Liyofilize kültür, Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerinde 37 °C'da 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiştir. Bakteri kültürü % 15 gliserol içeren TSB besiyerinde -20 °C'da dondurularak muhafaza edilmiş ve araştırma süresince aynı çalışma koşullarında aktifleştirilmiştir.

3.1.3 Besiyerleri

Cronobacter spp. izolasyonunda; Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS, Merck), Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST, Merck) ve Druggan-Forsythe-Iversen Agar (DFI, Oxoid) kullanılmıştır. Toplam aerobik mezofil bakteri sayımlarında; Plate Count Agar (PCA, Merck), koliform bakterilerin izolasyonunda; Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL, Merck), *Enterobacteriaceae* sayımında; Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Merck), gelişme parametrelerinin belirlenmesi ve termal direnç denemelerinde; Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) ve Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.4 Enzimler ve kimyasallar

Araştırmada kullanılan kimyasallar analitik safliktadır. Çalışmada kullanılan Agaroz Prona; 10X Tris-Borik asit-EDTA tamponu, Tris-EDTA tamponu ve EDTA AppliChem; DNA izolasyon kiti, PCR bileşenleri, DNA ladder moleküler ağılık belirteci ve 6X yükleme boya çözeltisi Fermantas; primerler Thermo; PCR saflaştırma kiti Promega; vankomisin ve biyokimyasal tanı kitleri Oxoid; maximum recovery diluent (MRD), NaCl, etidyum bromür, gliserol, etil alkol, metanol, kloroform, fenol, izoamilalkol ve HCl Merck firmalarından sağlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Cronobacter* spp. izolasyonu

Cronobacter spp. izolasyonu ISO/TS 22964 yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Kromojenik katı besiyerinde gelişen koloniler izole edilmiş ve biyokimyasal testlerle tanımlanmıştır. (Anonymous 2006).

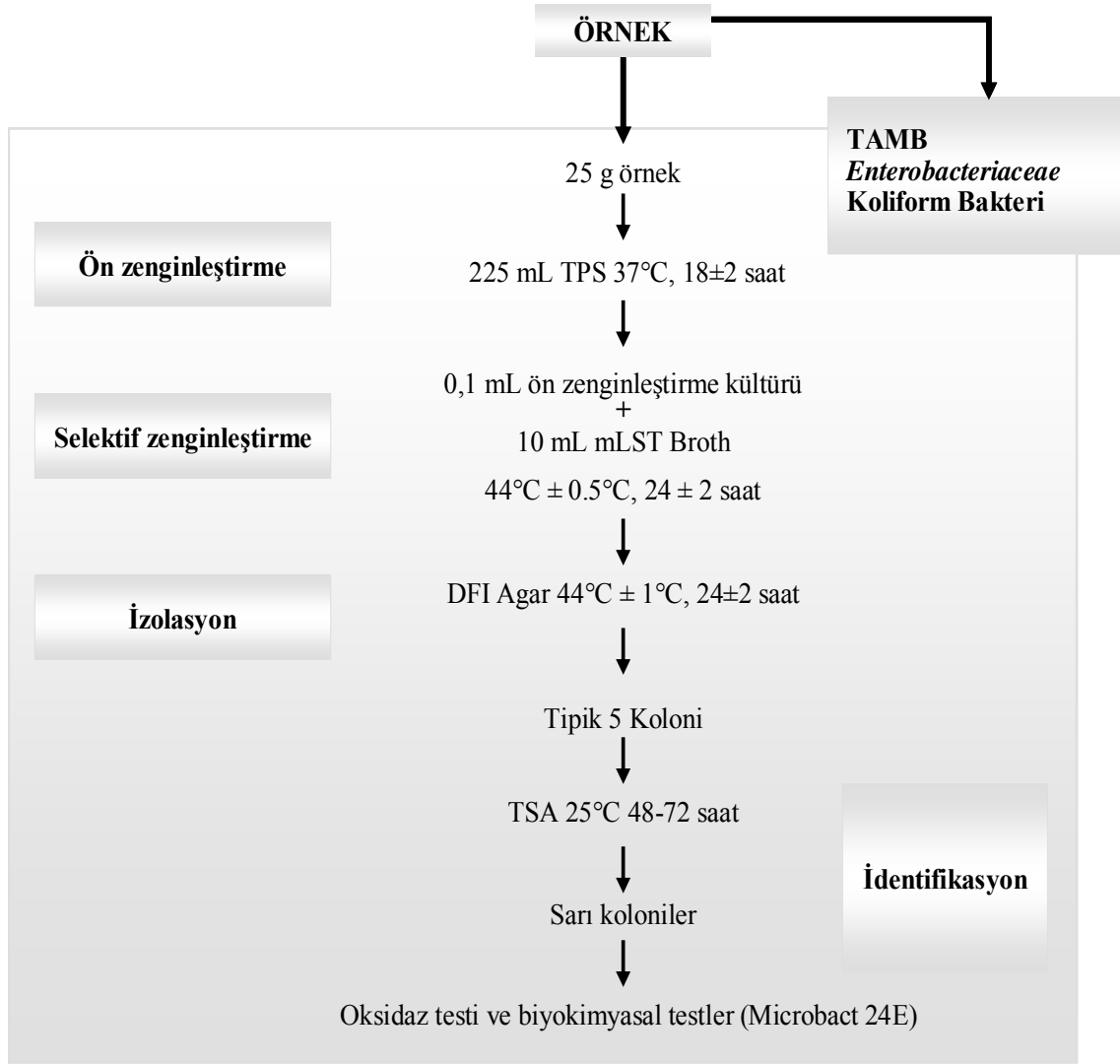
3.2.2 Toplam aerobik mezofil bakteri, koliform bakteri ve *Enterobacteriaceae* sayımı

Analize alınan örneklerde toplam aerobik mezofil bakteri, koliform bakteri ve *Enterobacteriaceae* sayımı standart yöntemlerle yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri, toplam mezofil aerobik bakteri için 28-30 °C'da 48 saat, *Enterobacteriaceae* ve koliform bakteri için 37 °C'da 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve inkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. Elde edilen sonuçlar log kob/g olarak ifade edilmiştir (Anonim 2005).

3.2.3 Morfolojik ve biyokimyasal identifikasyon

İzole edilen mikroorganizmaların saflık kontrolleri yapıldıktan sonra mikroskopta morfolojik yapı, katı besiyerinde koloni morfolojisi, Gram reaksiyonu, oksidaz testi gibi temel tanı testleri gerçekleştirilmiş ve ardından Microbact 24E (Oxoid) identifikasyon

sistemi ile biyokimyasal tanı testleri yapılmıştır. Tanısı yapılan mikroorganizmalar, % 15 gliserol içeren TSB besiyerinde -20 °C’da dondurularak muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 *Cronobacter* spp. izolasyonu

3.2.4 Moleküler identifikasyon

Moleküler tanı 16S rRNA dizi analizi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA yöntemi ile bakterilerin tanımlanması; DNA izolasyonu, izole edilen DNA'nın hedef bakteriye özgü primer çiftleri kullanılarak PCR'da çoğaltılması, çoğaltılan DNA'nın baz dizi sırasının belirlenmesi ve elde edilen dizilerin standart veri tabanındaki

mikroorganizma baz dizileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Çakır 2003).

Araştırma kapsamında analiz edilen örneklerden izole edilen ve biyokimyasal testlerle *Cronobacter* spp. olarak tanısı yapılan izolatların (farklı kaynaklardan izole edilen 17 adet izolat) DNA izolasyonu, PCR ve 16S rRNA dizi analizleri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.2.4.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu; bakterilerin lize edilmesi, proteinlerin uzaklaştırılması, DNA'nın çöktürülmesi ve temizlenmesi aşamalarından oluşmaktadır (Çakır 2003). Araştırmada bakteri izolatlarının DNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapılmıştır (Ausubel vd. 2003).

1. Katı besiyerinde 14-15 saatlik inkübasyon sonucunda gelişen hücreler darası alınmış 1.5 mL'lik Ependorf tüplerine alınarak 0.02-0.04 g olacak şekilde toplanır.
2. Hücreler 567 µL Tris-EDTA (TE) tamponunda çözülür.
3. 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış lizozim çözeltisinden 141.8 µL eklenerek 37 °C'da 15 dakika inkübe edilir.
4. % 10'luk SDS çözeltisinden 30 µL ve 20 mg/mL Proteinaz K çözeltisinden 3 µL eklenip karıştırılır ve 37 °C'da 1 saat inkübe edilir.
5. 100 µL 5M NaCl ve 80 µL CTAB/NaCl eklenir ve 65 °C'da 10 dakika inkübe edilir.
6. Eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenip 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
7. Üst faz alınıp eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) eklenip 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
8. Üst faz alınıp 0.6 µL izopropanol eklenir ve DNA çökene dek karıştırılıp 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

9. Süpernatant dökülerek 50 µL % 70'lik EtOH eklenir ve 5 dakika oda koşulunda 14000 rpm'de santrifüj edilerek DNA yıkanır.
10. Tüpler oda sıcaklığında kurutularak EtOH uzaklaştırılır.
11. Pelet 50-100 µL TE tamponu içerisinde çözülür.
12. RNase eklenerek 37 °C'da 45 dakika inkübe edilir ve RNA'lar uzaklaştırılır.
13. Kullanılıncaya kadar -20 °C'da muhafaza edilir.

Araştırmada elde edilen DNA örneklerinde miktar ve saflık tayini Nanodrop ND-1000 spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA'nın saflık kontrolü için 260/280 nm'deki absorbans değeri göz önünde tutulmuştur.

3.2.4.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), DNA veya RNA üzerindeki seçilmiş bir veya birden fazla sayıda bölgenin in vitro koşullarda oligonükleotit primerler ve Taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak PCR cihazı yardımıyla çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Temizkan vd. 1999). PCR analizleri için *Cronobacter* türlerine özgü primer çiftleri kullanılmış ve 16S rRNA gen bölgesi PCR'da çoğaltılmıştır (Apollo ATC201 Thermal Cycler). PCR ürünlerinin saflaştırılmasından sonra 16S rRNA dizi analizi yöntemi ile tanıları yapılmıştır.

Primerlerin belirlenmesi

PCR analizlerinde kullanılan 16S rRNA spesifik primerler National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında bulunan *Cronobacter* türlerine ait 16S rRNA dizileri ile hizalanarak % 100 homolojiyle uygunluğu belirlenmiştir. Belirlenen primer dizileri ile *Cronobacter* spp.'nin 16S rRNA gen bölgesinin 929 baz çiftlik (bç) bölümü çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılan *Cronobacter* türlerine özgü primer dizileri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 *Cronobacter* türlerine özgü primer dizileri (Lehner vd. 2004)

Primer	Dizi
Esak-F (Forward primer)	5' GCT YTG CTG ACG AGT GGC GG 3'
Esak-R (Reverse primer)	5' ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG 3'

PCR koşullarının optimizasyonu

PCR koşullarının standardizasyonu için öncelikle kullanılan genomik DNA, primer, tampon, MgCl₂, Taq Polimeraz'ın farklı konsantrasyonlarını içeren kombinasyonları ön deneylerle optimize edilmiştir. PCR reaksiyon karışımı; 250U Taq DNA polimeraz, 25 mM MgCl₂, 10X Taq buffer, (NH₄)₂SO₄, 10 mM dNTP mix, 50 µM forward primer (Thermo) ve 50 µM reverse primerden (Thermo) oluşmaktadır. PCR bileşenleri, karışım içerisindeki miktar ve son konsantrasyonları çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 PCR bileşenlerinin miktar ve konsantrasyonları

PCR bileşeni	PCR reaksiyon bileşen miktarları (µL)	Son konsantrasyon
10X Taq buffer, (NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	1X
10 mM dNTP mix	1.0	0.2 mM
50 µM Forward primer	0.3	0.25 uM
50 µM Reverse primer	0.3	0.25 uM
250 U Taq DNA polimeraz	0.3	1.25 U
200 ng Kalıp DNA	2.5	10 ng
25 mM MgCl ₂	2.0	1 mM
Nükleaz içermeyen su	38.6	
Toplam Hacim	50	

Uygun konsantrasyonlardan oluşan reaksiyon karışımına 94 °C'da 2 dakika ön denatürasyonu takiben 94 °C'da 30 saniye, 58 °C'da 30 saniye, 72 °C'da 30 saniye ve

72 °C’da 5 dakika son uzama olmak üzere 30 döngüden oluşan bir PCR (Apollo ATC201 Thermal Cycler) programı uygulanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 PCR cihazında ayarlanan döngülerin sıcaklık ve süreleri

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı (adet)
Başlangıç denatürasyonu	94	2 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	30
Bağlanma	58	30 saniye	30
Uzama	72	30 saniye	30
Son uzama	72	5 dakika	1

PCR ürünlerinin saflaştırılması

Kolon yöntemi ile PCR ürünlerini saflaştırmak için ‘Wizard SV Gel ve PCR Clean-Up System’ kiti (Promega) kullanılmıştır. PCR ürünlerinin saflaştırılmasında izlenen yol aşağıda verilmiştir.

1. DNA’ların hacimleri ölçülür.
2. Üzerlerine 1:1 oranında “membran binding” solüsyonundan eklenir ve pipetleme ile karıştırılır.
3. Kolonlar temiz tüpe takılır ve üzerlerine örnekler yüklenir. 1 dakika oda sıcaklığında beklenir.
4. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilir. Tüpte biriken sıvı dökülür.
5. Kolonlara 700 µL “membran wash” solüsyonu eklenir.
6. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilir. Tüpte biriken sıvı dökülür.
7. “Membran wash” solüsyonundan 500 µL eklenerek işlem tekrarlanır. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilir.
8. Tüpte biriken sıvı döküldükten sonra tekrar 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj edilir.

9. Kolonlar temiz tüpe takılıp, DNA isimleri tüpe ve kapağa yazılır.
10. Tüplerin kapağı bistüri yardımıyla ayrılır. 25 µL “nuclease free water” membrana değmeden tam ortasına bırakılır. 1 dakika bekletilir.
11. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilir.
12. Kolonlar atılıp, tüplerin kapakları kapatılır ve 4 °C’da saklanır.

3.2.4.3 Agaroz jel elektroforezi

İzolasyonu yapılan DNA örnekleri için % 1’lik agaroz jeller, PCR sonucunda elde edilen ampliconların analizi için % 1.5’lik agaroz jeller kullanılmıştır. Agaroz, 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA; 10X TBE: 0.9M Tris, 0.9M Borik Asit ve 0.02M EDTA) tamponunda eritildikten sonra DNA’nın ultraviyole ışık altında görünmesini sağlayan etidyum bromür ilave edilerek tarak içeren elektroforez kasetine dökülmüştür. Jel polimerize olduktan sonra 1X TBE içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. DNA örnekleri ve PCR ürünlerinden 10’ar µL alınarak, 2’şer µL 6X yükleme boya çözeltisi (Fermantas) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve ilk kuyucuğa yüklenen 100 bp’lik DNA ladder (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Fermantas) eşliğinde 90V elektrik akımında yaklaşık 90 dakika yürütülmüştür. Daha sonra jel, jel görüntüleme sistemi ile bilgisayarda incelenerek görüntüleri kaydedilmiştir (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak).

3.2.4.4 DNA dizi analizi

DNA dizi analizi, elde edilen PCR ürünlerinin saflaştırıldıktan sonra, floresan ile işaretli nükleotitlerle sonlandırılarak nükleotit dizisinin cihaz tarafından belirlenmesi esasına dayanan bir yöntemdir (Binnet 2006). Dizi analizi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Genombilim Birimi’nde Doç. Dr. Hilal Özdağ ve Uzm. Biyolog Nilgün Tekin tarafından modifiye edilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Araştırmada elde edilen nükleotit dizilerinin belirlenmesinde GenoLab™ Dye terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit ve otomatize floresanlı DNA dizi analizi cihazı (Beckman CEQ 8000) kullanılmıştır. PCR bileşenleri; 8 µL premiks, 0.5-10 µL DNA, 2 µL primerden (1.6 pmol/µL) ve 0-9.5 µL damıtık sudan oluşmaktadır

(toplam hacim 20 μ L). Reaksiyon karışımı, PCR cihazına yerleştirilerek 96 $^{\circ}$ C'da 3 dakika ilk denatürasyonu takiben 30 döngü olacak şekilde 96 $^{\circ}$ C'da 20 saniye denatürasyon, 55 $^{\circ}$ C'da 20 saniye bağlanma ve 60 $^{\circ}$ C'de 4 dakikalık uzama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen dizileme reaksiyonu PCR ürünleri EtOH ile çöktürülerek temizlenmiş ve dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizinde izlenen yol aşağıda verilmiştir

1. Ependorf tüplere sırasıyla 1 μ L 3M Na-asetat (pH 5.2), 10 μ L dizileme reaksiyonu PCR ürünü, 1 μ L 125 mM EDTA (pH 8.0) eklenip hafifçe karıştırılır.
2. 35 μ L soğuk % 100 EtOH eklenip hafifçe karıştırılır
3. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
4. 20 dakika 14000 rpm'de (4 $^{\circ}$ C) santrifüj edilir.
5. Süpernatant tamamen uzaklaştırılır.
6. 130 μ L % 70'lik soğuk EtOH eklenir.
7. 10 dakika 14000 rpm'de (4 $^{\circ}$ C) santrifüj edilir.
8. Süpernatant tamamen uzaklaştırılır.
9. 130 μ L % 70'lik soğuk EtOH eklenerek yıkama işlemi tekrarlanır.
10. Süpernatant uzaklaştırılarak tüpler kağıt havlu üzerine ters çevrilir ve alkolün tamamen uzaklaşarak peletin kuruması sağlanır.
11. Pelet üzerine 20 μ L Formamid eklenir, hafifçe karıştırılarak ve pipetleme yapılarak peletin çözülmesi sağlanır.
12. Örnekler Beckman Sample Plate'e yüklenir ve üzerlerine birer damla mineral yağ eklenir.
13. Beckman Buffer Plate'e kuyuların 3/4'ü dolacak şekilde "separation buffer" eklenir ve her iki plate cihaza yüklenir. Elde edilen nükleotit dizileri Gen Bankasından kontrol edilir.

3.2.4.5 16S rRNA sekans dizilerinin gen bankasındaki verilerle karşılaştırılması

Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) var olan diğer bakteriyel dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiş ve “MEGA (version 5.0) Bootstrap Test of Phylogeny (neighbor-joining)” yazılımı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Tamura vd. 2011).

3.2.5 *C. sakazakii* suşlarının farklı sıcaklık koşullarında gelişimi

3.2.5.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada *C. mytjensii* ATCC 51329 standart suşu ile bu araştırma kapsamında izole edilen ve *C. sakazakii* olarak moleküler tanısı gerçekleştirilen 4 adet suş kullanılmıştır (Çizelge 3.4). -20 °C’da dondurularak muhafaza edilen suşlar TSB besiyerine aktarılmış ve 37 °C’da 18 saat inkübe edilerek kültürler aktive edilmiştir. Araştırmada durma fazı hücreleri kullanılmıştır. Bunun için deneme öncesinde test bakterilerinin gelişim eğrisi çıkarılarak durma fazı belirlenmiştir.

Çizelge 3.4 Araştırma kapsamında kullanılmak üzere seçilen izolatlar ve kaynakları

İzolat No	Kaynağı
G1	Buğday unu
G17	Buğday irmiği
G40	Çavdar unu
G73	Bebek ek gıdası

3.2.5.2 Bebek maması örneği

Materyal olarak kullanılan toz bebek maması (başlangıç), Türkiye Atom Enerjisi Kurumu’nda (TAEK, SANAEM, Ankara) 10 kGy dozda ışınlanarak sterilize edilmiştir.

3.2.5.3 Bebek maması örneklerinin inokülasyonu ve farklı sıcaklıklarda depolanması

Üretici firmanın hazırlama talimatı doğrultusunda 100 mL kapasiteli vida kapaklı şişelerde steril su ile 50 mL bebek maması hazırlanmıştır. Hazırlanan bebek mamalarına son konsantrasyon $\sim 10^3$ kob/mL olacak şekilde 18 saatlik aktif kültürler inoküle edilmiştir. İnokülasyon yapılan bebek mamaları 4, 10, 20 ve 30 °C olmak üzere dört farklı sıcaklıkta inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla örnekler alınmıştır. 4 °C'da inkübe edilen örneklerden 10 gün süreyle ikişer gün aralıklarla, 10 °C'da inkübe edilen örneklerden 10 gün süreyle her gün, 20 ve 30 °C'da inkübe edilen örneklerden 24 saat boyunca her iki saatte bir örnek alınmıştır (Nazarowec-White ve Farber 1997b, Lenati vd. 2008). Aseptik koşullar altında alınan örnekler MRD dilüsyon sıvısı ile belirli aralıkta seyreltilmiştir. Tüm seyreltilerden TSA besiyerine standart yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonrasında besiyerinde oluşan koloniler sayılmıştır. Elde edilen sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir (Anonim 2005). Deneme iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.4 *C. sakazakii* suşlarının jenerasyon sürelerinin hesaplanması

Jenerasyon süresi, logaritmik dönemde bir popülasyondaki hücre sayısının iki katına çıkma süresi olarak tanımlanmaktadır (Tunail 2009). *C. sakazakii* suşlarının 10, 20 ve 30 °C'da jenerasyon süreleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$g = \frac{\log_2 (t - t_0)}{\log N - \log N_0}$$

Burada;

- g : Jenerasyon süresi (saat),
- t : Logaritmik fazın bitiş zamanı (saat),
- t_0 : Logaritmik fazın başlangıç zamanı (saat),
- N : t zamandaki bakteri sayısı (kob/mL),
- N_0 : t_0 zamandaki bakteri sayısı (kob/mL).

3.2.6 *C. sakazakii* suşlarının farklı pH koşullarında gelişimi

3.2.6.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması

Araştırmada durma fazı hücreleri kullanılmıştır. Bakteri kültürleri Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

3.2.6.2 *C. sakazakii* suşlarının pH 3.5’de gelişimi

TSB besiyerinin asitliği 5N HCl (Merck) ile pH 3.5’e ayarlanmış ve 0.45 µm por çaplı steril membran filtreden (Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edilmiştir. Asitliği ayarlanan steril TSB besiyerlerine son konsantrasyon $\sim 10^7$ kob/mL olacak şekilde 18 saatlik kültürlerden inoküle edilerek 37 °C’da inkübasyona bırakılmıştır (Edelson-Mammel vd. 2006). İnkübasyonun 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 12. saatlerinde örnek alınarak MRD ile belirli aralıkta seyreltilmiştir. Tüm seyreltilerden TSA besiyerine standart yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37 °C’da 24 saat inkübasyon sonrasında besiyerinde oluşan koloniler sayılmıştır. Elde edilen sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir (Anonim 2005). Deneme iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.3 *C. sakazakii* suşlarının farklı pH değerlerinde gelişimlerinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi

TSB besiyerinin asitliği 5N HCl (Merck) ile pH 4.5, 5.5 ve 7.0’a ayarlanmış ve 0.45 µm por çaplı steril membran filtreden (Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edilmiştir. pH’sı 4.5, 5.5 ve 7.0 olarak ayarlanan besiyerlerine son konsantrasyon $\sim 10^3$ kob/mL olacak şekilde 18 saatlik kültürlerden inoküle edilerek 37 °C’da 24-30 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun başlangıcından itibaren her saat aseptik koşullarda örnekler alınmış ve spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür (Temiz 1994, Tunail 2009). Denemeler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 *C. sakazakii* suşlarının termal dirençleri

3.2.7.1 Bakteri kültürlerinin hazırlanması

Araştırmada durma fazındaki bakteri kültürleri kullanılmıştır. Bakteri kültürleri Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

3.2.7.2 Bebek maması örneği

Termal inaktivasyon çalışmasında kullanılan toz bebek maması, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu’nda (TAEK, SANAEM, Ankara) 10 kGy dozda ışınlanarak sterilize edilmiştir.

3.2.7.3 Bebek maması örneklerinin inokülasyonu ve termal direnç denemesi

Üretici firmanın hazırlama talimatı izlenerek 100 mL kapasiteli kapaklı şişelerde steril saf su ile 50 mL bebek maması hazırlanmıştır. Önceden 54, 56 ve 58 °C’a ısıtılan bebek mamalarına ayrı ayrı son konsantrasyon $\sim 10^7$ kob/mL olacak şekilde 18 saatlik aktif kültürler inoküle edilmiştir. İnokülasyon işlemi gerçekleştirilmiş bebek mamalarına sıcaklık kontrollü bir su banyosu (GFL) yardımıyla 54, 56 ve 58 °C’larda belirli bir süre ile ısı işlem uygulanmıştır (Bakınız Ek 1). Tüm ısı işlem sürecinin sıcaklık değişimi, aynı koşullarda hazırlanmış 50 mL bebek maması bulunan bir şişe içerisinde, kalibre edilmiş bir thermocouple (Oregon Scientific NTS-912) yardımıyla izlenmiştir. Termal inaktivasyon işlemi sırasında belirli aralıklarla (Bakınız Ek 1) alınan örnekler aseptik koşullarda steril tüplere aktarılmış ve buzlu su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde soğutulmuştur (Shaker vd. 2008). Daha sonra örnekler MRD ile belirli aralıkta seyreltilmiştir. Tüm seyreltilerden TSA besiyerine standart yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37 °C’da 24 saat inkübasyon sonrasında besiyerinde oluşan koloniler sayılmıştır. Elde edilen sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir (Anonim 2005). Termal inaktivasyon denemeleri her bir sıcaklık için iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.4 *D* ve *z* değerlerinin hesaplanması

D değerleri; her sıcaklık için ısıtma süresine karşı örnekteki canlı bakteri sayılarının logaritmik değerlerinin grafiğe aktarılıp lineer regresyon modeli uygulanarak elde edilen matematiksel eşitlik ($y = ax + b$) yardımıyla hesaplanmıştır (*D* değeri = $-1/\text{eğim}$). *z* değerleri ise; elde edilen *D* değerlerinin uygulanan sıcaklık derecelerine karşı grafiğe aktarılıp lineer regresyon modeli uygulanarak elde edilen matematiksel eşitlik ($y = ax + b$) ile belirlenmiştir (*z* değeri = $-1/\text{eğim}$).

3.2.8 Direkt PCR yöntemi ile bebek mamalarında *Cronobacter* spp. tespiti

3.2.8.1 Bebek maması örneklerinin inokülasyonu

Bu denemede *C. muytjensii* ATCC 51329 standart suşu kullanılmıştır. % 15 gliserol içeren besiyerinde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da dondurularak muhafaza edilen bakteri TSB besiyerine aktarılmış ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da 18 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Materyal olarak kullanılan toz bebek maması, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda (TAEK, SANAEM, Ankara) 10 kGy dozda ışınlanarak sterilize edilmiştir. Bebek maması, üretici firmanın hazırlama talimatı doğrultusunda steril su ile hazırlanmıştır. Geri alma çalışmalarında belirli sayıda (10^1 - 10^6 kob/mL) *C. muytjensii* ATCC 51329 suşu steril bebek maması ortamına katılıp homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra herhangi bir ön zenginleştirme işlemi yapılmaksızın buradan alınan örnekte hedef bakterinin hangi sayıda geri alınabileceği tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu belirlemeler DNA izolasyon kiti kullanılarak ve kaynatma yöntemi ile ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

İkinci aşamada steril bebek maması örnekleri standart suş ile inoküle edilmiş (yaklaşık 10^0 , 10^1 ve 10^2 kob/mL) ve 4, 6 ve 8 saatlik ön zenginleştirme işlemi uygulanarak hedef bakterinin direkt PCR yöntemi ile belirlenmesi için gerekli optimum ön zenginleştirme süresi saptanmıştır.

3.2.8.2 DNA izolasyonu

C. muytjensii ATCC 51329 standart suşu inoküle edilmiş bebek mamalarından DNA izolasyonu iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir.

A) Bebek mamalarından *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA izolasyonu Fermantas Genomic DNA Purification Kit #K0512 yardımıyla gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonunda izlenen yol aşağıda verilmiştir.

1. 5 mL bebek maması örneği 12000 xg'de 10 dakika santrifüj edilir (Sigma 3K30). Elde edilen pelet 200 µl TE'de çözülür.
2. 400 µL "lysis solution" eklenir ve 65 °C'da 10 dakika inkübe edilir.
3. 600 µL kloroform eklenir ve hafifçe karıştırılarak 12000 xg'de 2 dakika santrifüj edilir.
4. Üst faz alınıp 800 µL "precipitation solution" eklenir, hafifçe karıştırılır ve 12000 xg'de 2 dakika karıştırılır.
5. Süpernatant tamamen uzaklaştırılır. DNA peleti 100 µL 1.2 M NaCl 'de çözülür. 300 µL soğuk EtOH eklenir ve -20 °C'da 10 dakika bekletilir.
6. 12000 x g'de 4 dakika santrifüj edilir. EtOH uzaklaştırılır. Pelet 50-100µL TE içerisinde çözülür.
7. Ekstraktlar kullanılıncaya kadar -20 °C'da muhafaza edilir.

B) Bebek maması örneğinde bulunan bakteriler kaynatma yöntemi ile lize edilerek DNA'ları açığa çıkarılmış ve buradan PCR aşamasına geçilerek hedef bakterinin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla izlenen yol aşağıda verilmiştir. (Mohan-Nair ve Venkitanarayanan 2006)

1. 1 mL bebek maması örneği 16000 xg'de 10 dakika santrifüj edilir (Sigma 3K30). Elde edilen pelet 1 mL steril damıtık suda çözülür.
2. Blok ısıtıcıda 100 °C'da 10 dakika kaynatılır (Thermolyne 17600 Dri-Bath).
3. 5000 xg'de 10 dakika santrifüj edilir.

4. Süpernatant yeni bir Ependorf tüpüne aktarılır. Elde edilen süpernatanta (10 µL) PCR işlemi uygulanır.

3.2.8.3 PCR amplifikasyonu

PCR analizlerinde kullanılan 16S rRNA spesifik primerlerin seçimi 3.2.4.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Bu spesifik primerlerin oligonükleotit dizilimi: Esak-F (Forward primer) 5’ GCT YTG CTG ACG AGT GGC GG 3’ ve Esak-R (Reverse primer) 5’ ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG 3’ şeklindedir.

PCR reaksiyon karışımı; 0.05 U/µL Taq DNA polymerase, 4mM MgSO₄, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP içeren PCR master mix (Fermantas), 50 µM forward primer (Thermo) ve 50 µM reverse primerden (Thermo) oluşmaktadır (Çizelge 3.5). Uygun konsantrasyonlardan oluşan reaksiyon karışımına PCR işlemi uygulanmıştır. PCR döngüsü; 94 °C’da 2 dakika ön denatürasyon, 94 °C’da 30 saniye, 58 °C’da 30 saniye, 72 °C’da 30 saniye (50 döngü) ve 72 °C’da 5 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5 PCR bileşenlerinin miktarları

PCR bileşeni	PCR reaksiyon bileşen miktarları (µL)
PCR master mix (1X)	25
Forward primer (0.25 µM)	0.3
Reverse primer (0.25 µM)	0.3
Kalıp DNA	10
Nükleaz içermeyen su	14.4
Toplam Hacim	50

3.2.8.4 Agaroz jel elektroforezi

PCR işlemi sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi için 3.2.4.3’de verilen işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.2.9 İstatistiksel değerlendirme

Mikrobiyolojik analiz sonuçlarına ilişkin veriler logaritmik değerlere çevrildikten sonra varyans analizi yapılmış ve farklılık görülen gruplarda farklılığın hangi düzeyde olduğu Duncan testi ile belirlenmiştir (Düzgüneş vd. 1987).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 *Cronobacter* spp. İzolasyonu ve Biyokimyasal İdentifikasyon Sonuçları

Türkiye'deki bebek mamalarının ve bebek ek gıdalarının risk potansiyelini belirlemek amacıyla toplam 200 örnekte *Cronobacter* spp., toplam aerobik mezofil bakteri, koliform bakteri ve *Enterobacteriaceae* analizleri gerçekleştirilmiştir.

Analize alınan toplam 100 adet başlangıç ve devam toz bebek mamalarının 25 gramında *Cronobacter* spp. belirlenmemiştir. Koliform bakteri ve *Enterobacteriaceae* sayılarının 1 log kob/g'dan az olduğu, TAMB sayılarının ise <1-3.29 log kob/g düzeyinde olduğu saptanmıştır. Bebek mamaları için elde edilen bulgular, Türk Gıda Mevzuatı Bebek ve Devam Formülleri Tebliği (Anonim 2009a, Anonim 2009b) tarafından bildirilen mikrobiyolojik kriterlere uygundur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Bebek ve devam formüllerinin mikrobiyolojik özellikleri (Anonim 2009a, 2009b)

Mikroorganizma	Sayı (kob/g)
Toplam aerobik mezofilik bakteri	1.0x10 ⁴
Koliform	2.0x10 ¹
Toplam Maya ve Küf	1.0x10 ²
<i>Bacillus cereus</i>	1.0x10 ²
<i>Escherichia coli</i>	Bulunmamalı
<i>Salmonella</i> spp.	25 g'da bulunmamalı
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bulunmamalı
<i>Cronobacter</i> spp. ¹	25 g'da bulunmamalı
<i>Clostridium perfringens</i>	Bulunmamalı
<i>Listeria monocytogenes</i>	25 g'da bulunmamalı

¹: Türk Gıda Mevzuatı Bebek ve Devam Formülleri Tebliği'nde *Enterobacter sakazakii* olarak verilmiştir.

Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları, Türk Gıda Mevzuatı Bebek ve Küçük Çocuk Ek Gıdaları Tebliği kapsamında işlenmiş tahıl bazlı ek gıdalar ve tahıl bazlı olmayan ek gıdalar olmak üzere iki grup altında toplanmıştır (Anonim 2009c). Araştırmada tahıl bazlı ve tahıl bazlı olmayan (meyveli, sebze) toplam 40 adet bebek ek gıdası analize alınmıştır. Analize alınan bebek ek gıdaları içerisinde yalnızca tahıl bazlı ek gıdada

(BEG 24) *Cronobacter* spp. belirlenirken (% 2.5), diğer ek gıdalarda bu bakteriye rastlanmamıştır. *Cronobacter* spp. ile kontaminasyonun, ek gıda üretiminin bir aşamasında gıdaya doğrudan bulaşması ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bebek ek gıdalarının TAMB sayıları <1-2.30 log kob/g değerleri arasında değişirken, koliform bakteri sayıları <1-1.58 log kob/g ve *Enterobacteriaceae* sayıları <1-1.65 log kob/g değerleri arasındadır.

Analiz edilen bebek ek gıdalarının % 12.5'inin *Enterobacteriaceae* ve koliform bakteri ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Türk Gıda Mevzuatı Bebek ve Küçük Çocuk Ek Gıdaları Tebliği'nde belirtilen mikrobiyolojik kriterlere uygundur (Çizelge 4.2). Üretici firmalar tarafından ek gıdalar, 4-36 aylık bebek ve küçük çocukların tüketimine sunulmaktadır. Tahıl bazlı ek gıdada *Cronobacter* spp.'nin belirlenmesi özellikle mide asitliği yeterince gelişmemiş bebekler (< 6 ay) için bir risk faktörü olabilir.

Çizelge 4.2 Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları mikrobiyolojik özellikleri (Anonim 2009c)

Mikroorganizma	Sayı (kob/g)
Toplam aerobik mezofilik bakteri	1.0x10 ⁴
Koliform	2.0x10 ¹
Toplam Maya ve Küf	1.0x10 ²
<i>Bacillus cereus</i>	1.0x10 ²
<i>Escherichia coli</i>	Bulunmamalı
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bulunmamalı
<i>Clostridium perfringens</i>	Bulunmamalı
<i>Salmonella</i> spp.	25 g'da bulunmamalı
<i>Listeria monocytogenes</i>	25 g'da bulunmamalı

Cronobacter spp., pek çok gıdada, çevresel ve klinik örnekte tespit edilmiş olmasına rağmen, yenidoğan bebeklerde görülen enfeksiyonlar sebebiyle bebek maması ve süt tozu ile ilişkilendirilmiş ve bebek mamasında *Cronobacter* spp. varlığına yönelik çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Muytjens vd. 1988, Nazarowec-White ve Farber 1997b, Heuvelink vd. 2001, Iversen ve Forsythe 2004b, Leuschner vd. 2004, Shaker vd. 2007, Chap vd. 2009, El-Sharoud vd. 2009, Jaradat vd. 2009, O'Brien vd. 2009a).

Bebek maması üretimi sırasında uygulanan pastörizasyon işleminin *Cronobacter* spp.'yi inaktive etmek için yeterli olduğu ancak üretimin herhangi bir aşamasında rekontaminasyonun meydana gelebileceği belirtilmektedir. Potansiyel kontaminasyonun bebek maması üretiminde pastörizasyon sonrasında ısıya duyarlı kontamine besin elementlerinin eklenmesi ile ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Healy vd. 2010, Reich vd. 2010). Yapılan bir araştırmada ise üretimin ısı işlem uygulanan sprey kurutma aşamasında bakterinin canlı kalabildiği belirlenmiştir (Arku vd. 2008).

Yapılan araştırmalarda bebek mamalarındaki *Cronobacter* spp. kontaminasyon düzeyinin oldukça düşük olduğu (0.36-66 kob/100 g) bildirilmiştir. Araştırmada analiz edilen tahıl bazlı ek gıda örneği (BEG 24) incelendiğinde, *Enterobacteriaceae* içeriğinin <1 log kob/g düzeyinde olmasına karşın örnekte *Cronobacter* spp. belirlenmesi bu literatür bilgisini doğrular niteliktedir.

Analize alınan bebek maması ve bebek ek gıda bileşenlerine ilişkin *Cronobacter* spp., toplam aerobik mezofil bakteri, koliform grup bakteri ve *Enterobacteriaceae* analiz sonuçları çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, bebek ek gıdası bileşeni olarak analize alınan tahıl ürünlerinden buğday irmiği, buğday unu, çavdar unu, akdarı unu, pirinç unu, yulaf unu, arpa unu ve darı ununda *Cronobacter* spp. saptanırken (14/35); bileşenlerden mısır irmiği, süt tozu, peyniraltı suyu tozu, meyve ve sebze parçacıklarında *Cronobacter* spp. belirlenmemiştir. Analiz edilen tahıl ürünlerinin % 82.9'unun *Enterobacteriaceae* ile kontamine olduğu, bunlardan % 60'nın *Cronobacter* spp., % 32'sinin *E. cloacae*, % 20'sinin *K. pneumoniae* ve % 20'sinin *E. agglomerans* içerdiği saptanmıştır (Çizelge 4.4). Bebek maması üretiminde kullanılan hammadde örneklerinden *Enterobacteriaceae* identifikasyonu üzerine yapılan bir araştırmada, *E. cloacae*, *Pantoea* spp. ve *K. pneumoniae*'nin en sık izole edilen türler olduğu bildirilmiştir (Popp vd. 2009).

Çizelge 4.3 Bebek maması ve bebek ek gıdası bileşenlerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları (log kob/g)

Örnek	<i>Cronobacter</i> spp.	TAMB	<i>Enterobacteriaceae</i>	Koliform
Buğday irmiği	25 g'da var	2.80	1.70	<1
Buğday irmiği	25 g'da yok	3.00	2.42	2.29
Buğday irmiği	25 g'da var	3.84	3.27	3.21
Buğday irmiği	25 g'da yok	4.40	4.07	4.00
Mısır irmiği	25 g'da yok	3.33	1.30	2.18
Mısır irmiği	25 g'da yok	3.18	<1	<1
Mısır irmiği	25 g'da yok	1.70	1.00	<1
Mısır irmiği	25 g'da yok	2.15	2.13	1.93
Buğday unu	25 g'da var	3.75	3.50	3.34
Buğday unu	25 g'da yok	2.85	1.34	1.30
Buğday unu	25 g'da yok	2.65	1.54	<1
Buğday unu	25 g'da var	3.83	3.56	3.38
Çavdar unu	25 g'da var	2.32	2.00	1.78
Çavdar unu	25 g'da yok	2.95	1.67	<1
Çavdar unu	25 g'da yok	3.24	2.02	1.60
Çavdar unu	25 g'da yok	<1	<1	<1
Akdarı unu	25 g'da var	2.30	2.18	2.00
Akdarı unu	25 g'da var	3.26	<1	<1
Akdarı unu	25 g'da var	2.32	<1	<1
Akdarı unu	25 g'da yok	2.21	1.40	1.30
Pirinç unu	25 g'da yok	3.18	1.90	1.70
Pirinç unu	25 g'da yok	2.50	1.30	1.18
Pirinç unu	25 g'da var	3.16	1.43	2.41
Yulaf unu	25 g'da var	2.90	1.70	<1
Yulaf unu	25 g'da yok	2.16	<1	<1
Yulaf unu	25 g'da yok	3.12	2.98	2.86
Yulaf unu	25 g'da var	3.66	3.32	3.29
Arpa unu	25 g'da yok	2.48	1.54	1.00
Arpa unu	25 g'da var	4.08	3.57	3.54

Çizelge 4.3 Bebek maması ve bebek ek gıdası bileşenlerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları (devam)

Örnek	<i>Cronobacter</i> spp.	TAMB	<i>Enterobacteriaceae</i>	Koliform
Arpa unu	25 g'da yok	2.61	<1	<1
Arpa unu	25 g'da var	2.35	1.30	1.30
Darı unu	25 g'da yok	3.27	2.98	2.90
Darı unu	25 g'da yok	3.15	2.66	1.93
Darı unu	25 g'da yok	1.95	1.70	<1
Darı unu	25 g'da var	4.29	4.26	4.22
PAS tozu ¹	25 g'da yok	1.54	<1	<1
PAS tozu ¹	25 g'da yok	2.26	<1	<1
PAS tozu ¹	25 g'da yok	1.00	<1	<1
PAS tozu ¹	25 g'da yok	3.19	<1	<1
PAS tozu ¹	25 g'da yok	2.04	<1	<1
Süt tozu	25 g'da yok	3.10	<1	<1
Süt tozu	25 g'da yok	3.33	<1	<1
Süt tozu	25 g'da yok	3.21	<1	<1
Süt tozu	25 g'da yok	3.33	<1	<1
Süt tozu	25 g'da yok	3.16	<1	<1
İspanak parçacığı	25 g'da yok	3.43	<1	<1
Brokoli parçacığı	25 g'da yok	2.43	<1	<1
Kabak parçacığı	25 g'da yok	3.19	<1	<1
Patates parçacığı	25 g'da yok	3.04	<1	<1
Havuç parçacığı	25 g'da yok	1.90	<1	<1
Pırasa parçacığı	25 g'da yok	1.81	<1	<1
Portakal parçacığı	25 g'da yok	<1	<1	<1
Armut parçacığı	25 g'da yok	1.54	<1	<1
Elma parçacığı	25 g'da yok	<1	<1	<1
Muz parçacığı ²	25 g'da yok	<1	<1	<1
Muz tozu ²	25 g'da yok	<1	<1	<1
Elma tozu ²	25 g'da yok	<1	<1	<1

¹:PAS: peyniraltı suyu, ²: Muz parçacığı, elma tozu ve muz tozundan ikişer adet örnek analiz edilmiştir.

Bu araştırma kapsamında bebek ek gıdası ve bileşenlerden elde edilen 80 adet izolatin morfolojik yapı, Gram reaksiyonu, oksidaz testi gibi temel tanı testleri gerçekleştirilmiş ve α -glucosidase (α -GLUC) aktivitesi DFI Agar besiyerinde belirlenip, ardından Microbact 24E (Oxoid) identifikasyon sistemi ile biyokimyasal testleri yapılmıştır (Çizelge 4.4). Microbact 24E test kiti ile; Nitrat indirgenmesi (NIT), Lisin dekarboksilasyonu (LYS), Ornithin dekarboksilasyonu (ORN), Hidrojen sülfür oluşumu (H_2S), Glukoz fermantasyonu (GLU), Mannitol fermantasyonu (MAN), Ksiloz fermantasyonu (XYL), β -D-galaktosidase (ONPG), İndol oluşturma (IND), Üre hidrolizi (URE), Voges Proskauer test (VP), Sitrat kullanımı (CIT), Triptofan deaminasyonu (TDA), Jelatin testi (GEL), Maltoz fermantasyonu (MAL), İnositol fermantasyonu (INO), Sorbitol fermantasyonu (SOR), Ramnoz fermantasyonu (RHA), Sakkaroz fermantasyonu (SUC), Laktoz fermantasyonu (LAC), Arabinoz fermantasyonu (ARA), Adonitol fermantasyonu (ADO), Rafinoz fermantasyonu (RAF), Salisin fermantasyonu (SAL), Arjinin dehidrolaz (ARG) testleri gerçekleştirilmiştir.

Biyokimyasal identifikasyon sonucunda *Cronobacter* spp. dışında yaygın olarak tanımlanan bakteriler, *E. cloacae*, *E. agglomerans* ve *K. pneumoniae* olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). 35 ülkeden temin edilen 141 toz bebek maması örneği üzerine yapılan bir çalışmada, örneklerin % 52.2'sinin *Enterobacteriaceae* ile kontamine olduğunu, bunlardan % 25'inin *E. agglomerans*, % 21'inin *E. cloacae* ve % 14'ünün *Cronobacter* spp. içerdiği tespit edilmiştir (Muytjens vd. 1988). Estuningsih vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, Endonezya ve Güneydoğu Asya'da tüketime sunulan toz bebek mamaları *Enterobacteriaceae* varlığı açısından incelenmiş ve bebek mamalarından *Cronobacter* spp. de dahil olmak üzere *Pantoea* spp., *E. hermannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. ve *E. coli* izole edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise analize alınan devam mamalarının % 3 (3/91)'ünde, bebek gıdalarının ise % 12 (24/199)'ünde *C. sakazakii* belirlenmiştir. Araştırma kapsamında devam mamalarından *C. sakazakii* dışında *A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* ve *S. ficaria* izole edilmiştir (Chap vd. 2009).

Çizelge 4.4 Bebek ek gıdası ve bebek maması bileşenlerinden izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat No	Kaynağı*	TESTLER																								İdentifikasyon Sonucu					
		GRAM	OXIDASE	α-GLUC	NIT	LYS	ORN	H ₂ S	GLU	MAN	XYL	ONPG	IND	URE	VP	CIT	TDA	GEL	MAL	INO	SOR	RHA	SUC	LAC	ARA		ADO	RAF	SAL	ARG	
G21	MS İR	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>E. cloacae</i> (%98.02)	
G22	MS İR	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>E. cloacae</i> (%99.99)	
G23	MS İR	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>A. baumannii</i> (%99.99)	
G24	MS İR	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>A. baumannii</i> (%99.99)	
G25	MS İR	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>A. baumannii</i> (%99.99)	
G26	PR UN	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>K. pneumoniae</i> (%99.89)	
G27	PR UN	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>E. dissolvens</i> (%52.49)	
G28	PR UN	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%96.27)
G29	PR UN	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%96.27)
G30	PR UN	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>E. cloacae</i> (%99.99)
G31	PR UN	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>E. cloacae</i> (%99.99)
G32	AR UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>E. amnigenus</i> (%65.69)
G33	AR UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.94)
G34	AR UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.94)
G35	AR UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.94)
G36	AR UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>Cronobacter</i> spp. (%80.87)
G37	AR UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>Cronobacter</i> spp. (%80.87)
G38	AR UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>Cronobacter</i> spp. (%80.87)
G39	ÇV UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>E. amnigenus</i> (%65.69)
G40	ÇV UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.74)

*BD UN: Bugday unu; BD İR: Bugday irmiği; MS İR: Mısır irmiği; PR UN: Pirinç unu; AR UN Arpa unu; ÇV UN:Çavdar unu; YL UN: Yulaf unu; AD UN: Akdarı unu; DR UN: Darı unu; EK GD: Ek Gıda.

Çizelge 4.4 Bebek ek gıdası ve bebek maması bileşenlerinden izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat No	Kaynağı*	TESTLER																								İdentifikasyon Sonucu					
		GRAM	OXIDASE	α-GLUC	NIT	LYS	ORN	H ₂ S	GLU	MAN	XYL	ONPG	IND	URE	VP	CIT	TDA	GEL	MAL	INO	SOR	RHA	SUC	LAC	ARA		ADO	RAF	SAL	ARG	
G41	ÇV UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Cronobacter spp. (%99.74)	
G42	ÇV UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	E. agglomerans (%98.86)	
G43	ÇV UN	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	E. cloacae (%99.99)	
G44	ÇV UN	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	E. cloacae (%99.99)	
G45	ÇV UN	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	E. cloacae (%99.99)	
G46	YL UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	Cronobacter spp. (%99.74)	
G47	YL UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	Cronobacter spp. (%99.74)	
G48	YL UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	Cronobacter spp. (%99.74)	
G49	YL UN	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	E. cloacae (%98.33)
G50	YL UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	Cronobacter spp. (%99.88)	
G51	YL UN	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	K. oxytoca (%91.67)
G52	YL UN	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	K. pneumoniae (%94.36)
G53	AD UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	S. ficaria (%99.86)
G54	AD UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	Cronobacter spp. (%99.74)
G55	AD UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	Cronobacter spp. (%99.74)
G56	AD UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	E. agglomerans (%89.82)
G57	AD UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	Cronobacter spp. (%80.87)
G58	AD UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	Cronobacter spp. (%80.87)
G59	AD UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	Cronobacter spp. (%80.87)
G60	AD UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	Cronobacter spp. (%99.65)

*BD UN: Bugday unu; BD İR: Bugday irmiği; MS İR: Mısır irmiği; PR UN: Pirinç unu; AR UN Arpa unu; ÇV UN:Çavdar unu; YL UN: Yulaf unu; AD UN: Akdarı unu; DR UN: Darı unu; EK GD: Ek Gıda.

Çizelge 4.4 Bebek ek gıdası ve bebek maması bileşenlerinden izole edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat No	Kaynağı*	TESTLER																								İdentifikasyon Sonucu					
		GRAM	OXIDASE	α-GLUC	NIT	LYS	ORN	H ₂ S	GLU	MAN	XYL	ONPG	IND	URE	VP	CIT	TDA	GEL	MAL	INO	SOR	RHA	SUC	LAC	ARA		ADO	RAF	SAL	ARG	
G61	AD UN	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.65)	
G62	AD UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>E. agglomerans</i> (%88.80)	
G63	AD UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>E. agglomerans</i> (%88.80)	
G64	DR UN	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>K. pneumoniae</i> (%99.89)
G65	DR UN	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>K. pneumoniae</i> (%99.89)
G66	DR UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>E. cloacae</i> (%97.56)
G67	DR UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>E. cloacae</i> (%97.56)
G68	DR UN	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>E. cloacae</i> (%97.56)
G69	DR UN	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.99)
G70	DR UN	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.99)
G71	DR UN	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>E. coli</i> (%99.50)
G72	DR UN	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>E. coli</i> (%99.50)
G73	EK GD	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.94)
G74	EK GD	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.94)
G75	EK GD	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.94)
G76	EK GD	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Cronobacter</i> spp. (%99.94)
G77	EK GD	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. agglomerans</i> (%99.99)
G78	EK GD	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. agglomerans</i> (%99.99)
G79	EK GD	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. agglomerans</i> (%99.99)
G80	EK GD	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>E. agglomerans</i> (%99.99)

*BD UN: Bugday unu; BD İR: Bugday irmiği; MS İR: Mısır irmiği; PR UN: Pirinç unu; AR UN Arpa unu; ÇV UN:Çavdar unu; YL UN: Yulaf unu; AD UN: Akdarı unu; DR UN: Darı unu; EK GD: Ek Gıda.

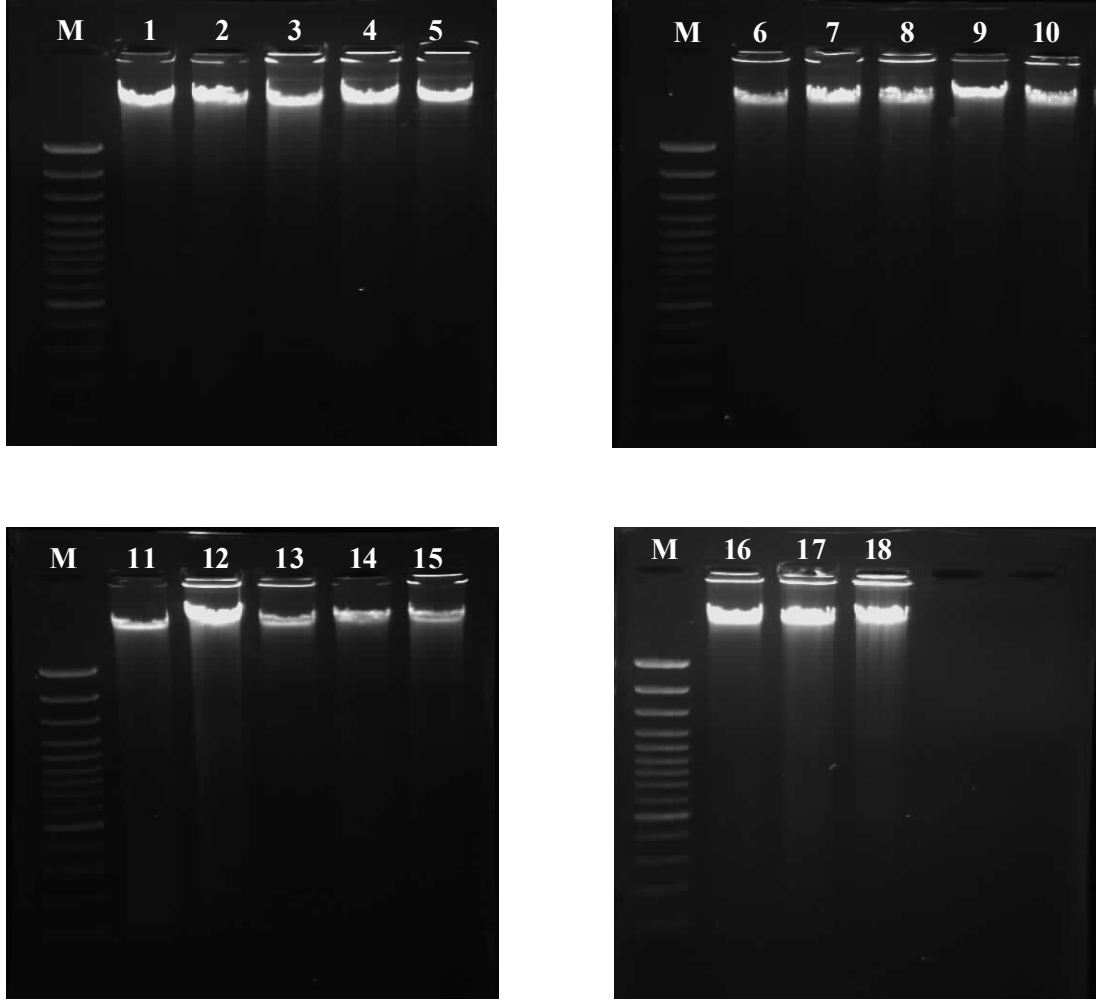
4.2 Moleküler İdentifikasyon Sonuçları

Moleküler biyoloji alanındaki birçok çalışmanın temelini genetik tiplendirme oluşturmaktadır. Genetik tiplendirme çalışmaları mikroorganizmaların tür ve alt tür seviyesinde ayrılabilmesi ve aralarındaki çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasını olanaklı kılmaktadır. Son yıllarda mikroorganizmaların genetik tiplendirme çalışmalarında tüm gen bölgelerinin analizine imkân sağlayan, sınıflandırma ve karakterizasyonda oldukça hızlı bir yöntem olan PCR temelli teknikler kullanılmaktadır.

Günümüzde yapılan tür tayinlerinin büyük bir kısmı 16S rRNA'yı kodlayan DNA fragmentinin sekans dizisinin belirlenmesine dayanmaktadır. 16S rRNA dizilerinin kıyaslanması mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ve evrimsel yakınlığın belirlenmesi için kullanılan güçlü bir araçtır. Bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan gen bölgesi 16S rRNA'dır. 16S rRNA geni, yapısında tüm bakteri genomunda olan değişmeyen bölgelerle birlikte, her bakteri genomunda kendine özgü olan değişken bölgeler bulundurur. Bakteri teşhisinde değişken bölgeler kullanılıyor olup, 16S rRNA geninde 8 adet korunmuş değişmeyen bölge ile 9 adet benzersiz değişken bölge bulunmaktadır. Korunmuş bölgeler primer çoğaltma teknikleri için büyük ölçüde uygulanabilir başlangıç bölgeleri sağlarken, benzersiz değişken bölgeler de bakteriler arası filogenetik yakınlığı belirlemede kullanılır. 16S rRNA gen dizisi açısından % 95'den fazla benzerlik bulunan bakterilerin aynı cinse ait türler olduğu kabul edilmektedir (Çakır 2003, Acar 2009).

4.2.1 DNA izolasyonu sonuçları

Araştırma kapsamında analiz edilen örneklerden izole edilen ve biyokimyasal testlerle *Cronobacter* spp. olarak tanısı yapılan 17 izolat ile kontrol *C. muytjensii* ATCC 51329 suşuns ait DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri şekil 4.1'de verilmiştir.

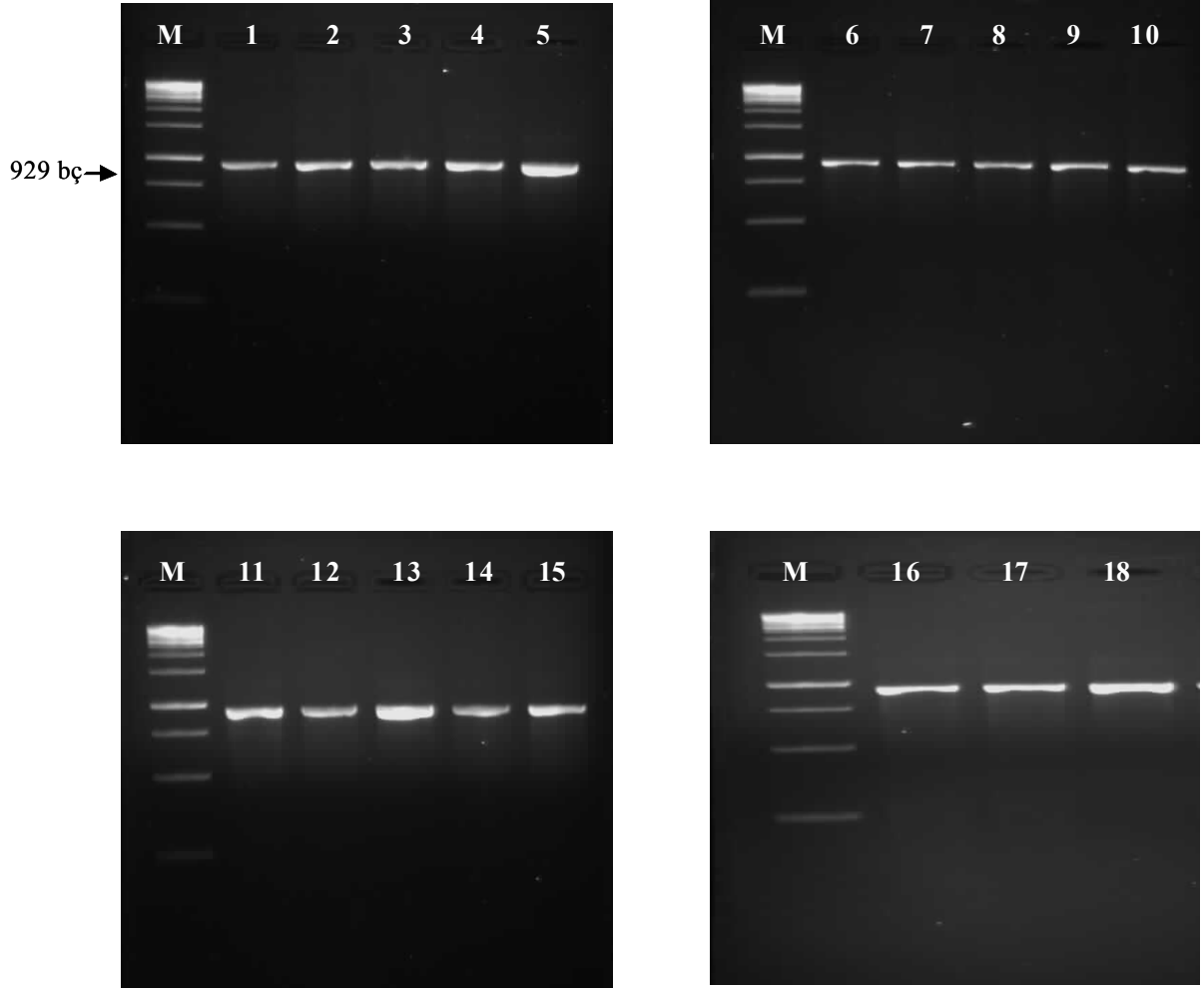


Şekil 4.1 *Cronobacter* spp. izolatlarından elde edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri

M: Marker (100 bp DNA ladder), 1: *C. muytjensii* ATCC 51329, 2: G1, 3: G6, 4: G12, 5: G17, 6: G28, 7: G33, 8: G36, 9: G40, 10: G46, 11: G50, 12: G54, 13: G58, 14: G60, 15: G62, 16: G69, 17: G73, 18: G77

4.2.2 PCR analiz sonuçları

PCR analizleri için *Cronobacter* türlerine özgü primer çiftleri kullanılmış ve bakterinin 16S bölgesindeki 929 bp'lik bölümü PCR'da çoğaltılmış, ardından saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Spesifik primerler ile yapılan PCR sonucunda beklenen boyuttaki DNA bantlarının belirgin olarak saptanabildiği görülmüştür. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. *Cronobacter* spp. izolatlarına ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri

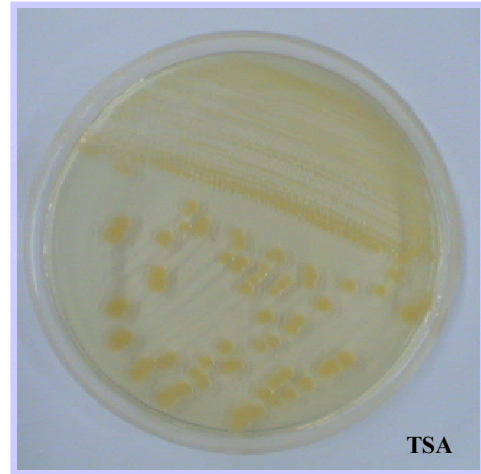
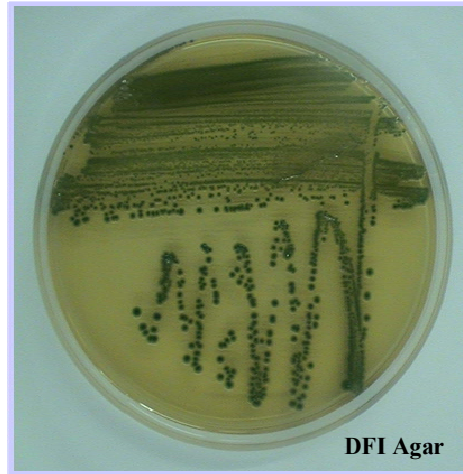
M: Marker (100 bp DNA ladder), 1: *C. muytjensii* ATCC 51329, 2: G1, 3: G6, 4: G12, 5: G17, 6: G28, 7: G33, 8: G36, 9: G40, 10: G46, 11: G50, 12: G54, 13: G58, 14: G60, 15: G62, 16: G69, 17: G73, 18: G77

4.2.3 DNA dizi analizi sonuçları

Cronobacter spp. izolatlarının DNA dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotit dizileri NCBI veri tabanlarında BLAST programı kullanılarak diğer bakteriyel 16S rRNA gen dizileri karşılaştırılmış ve benzerlik oranları tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Sekans dizilerine göre tanısı yapılan *Cronobacter* spp. izolatlarının GenBank'tan alınan referans *Cronobacter* spp. dizileri ile akrabalık dereceleri MEGA 5 Bootstrap Test of Phylogeny (neighbor-joining) yazılımı (Tamura vd. 2011) ile oluşturulan filogenetik ağaç ile belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.5 *Cronobacter* spp. izolatlarına ait biyokimyasal identifikasyon ve 16S rRNA dizi analizi sonuçları

İzolat No	Kaynağı	Microbact 24E ID (%)	16S rRNA Dizi Analizi (%)
G1	Buğday unu	<i>Cronobacter</i> spp. (99.65)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G6	Buğday unu	<i>Cronobacter</i> spp. (94.66)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G12	Buğday irmiği	<i>Cronobacter</i> spp. (98.41)	<i>C. sakazakii</i> (99)
G17	Buğday irmiği	<i>Cronobacter</i> spp. (99.61)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G28	Pirinç unu	<i>Cronobacter</i> spp. (96.27)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G33	Arpa unu	<i>Cronobacter</i> spp. (99.65)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G36	Arpa unu	<i>Cronobacter</i> spp. (80.87)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G40	Çavdar unu	<i>Cronobacter</i> spp. (99.74)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G46	Yulaf unu	<i>Cronobacter</i> spp. (99.74)	<i>C. sakazakii</i> (99)
G50	Yulaf unu	<i>Cronobacter</i> spp. (99.88)	<i>C. sakazakii</i> (99)
G54	Akdarı unu	<i>Cronobacter</i> spp. (99.74)	<i>C. sakazakii</i> (99)
G58	Akdarı unu	<i>Cronobacter</i> spp. (80.87)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G60	Akdarı unu	<i>Cronobacter</i> spp. (99.65)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G62	Akdarı unu	<i>E. agglomerans</i> (88.80)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G69	Darı unu	<i>Cronobacter</i> spp. (99.99)	<i>C. muytjensii</i> (99)
G73	Bebek ek gıdası	<i>Cronobacter</i> spp. (99.94)	<i>C. sakazakii</i> (100)
G77	Bebek ek gıdası	<i>E. agglomerans</i> (99.99)	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> (99)

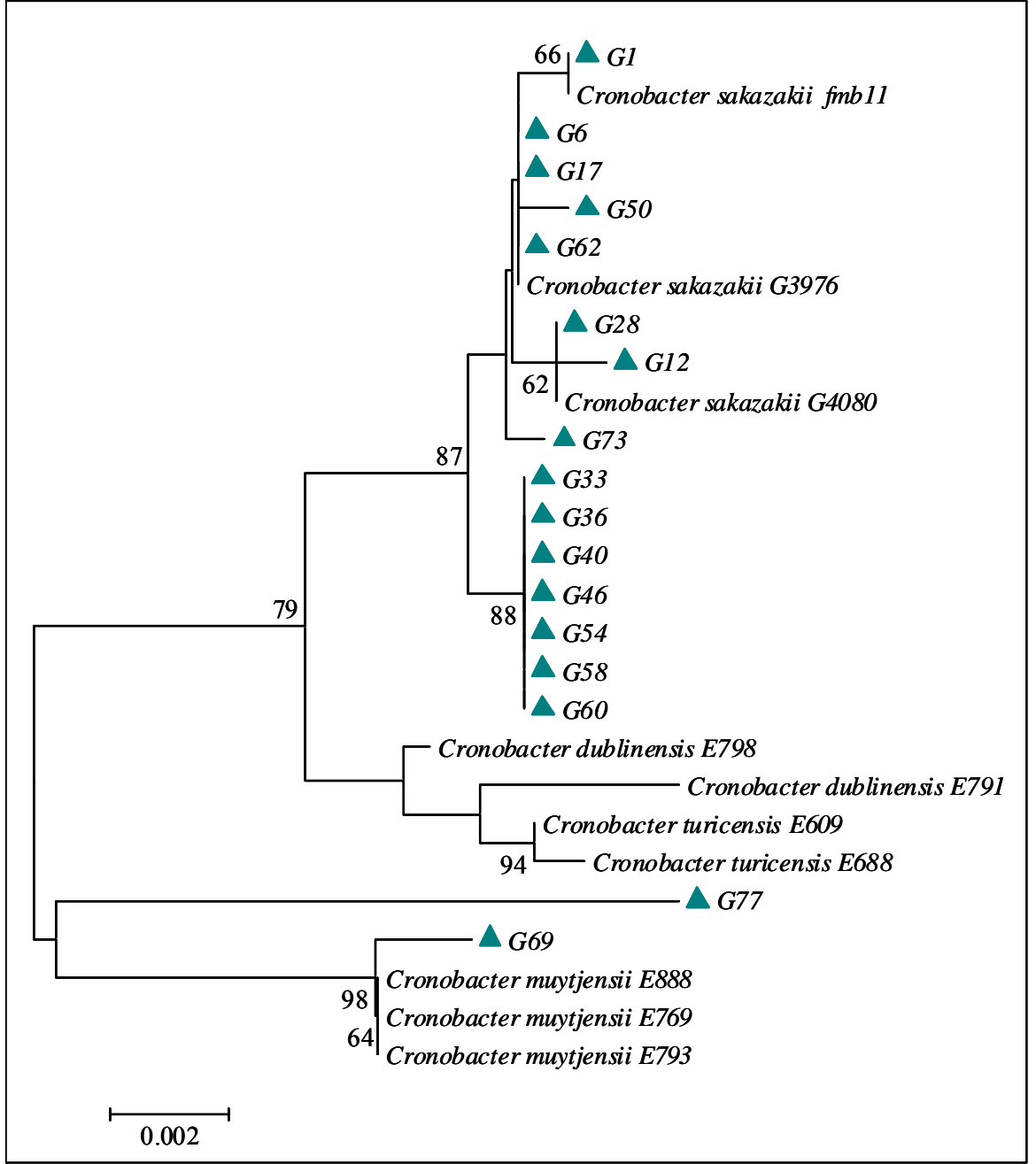


Şekil 4.3 *Cronobacter* spp.'nin α -glucosidase aktivitesi sonucu DFI Agar ve TSA'da oluşturduğu tipik koloniler

Çizelge 4.5 incelendiğinde, Microbact 24E (Oxoid) identifikasyon sistemi ile gerçekleştirilen biyokimyasal identifikasyon sonuçlarının, iki izolat dışında 16S rRNA sekans analizi sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Tahıl ürünlerinden izole edilen ve biyokimyasal analiz sonucunda *Cronobacter* spp. olarak belirlenen 14 izolat sekans analizi sonucunda *C. sakazakii* olarak tanımlanmıştır. Buna karşın darı unundan izole edilen ve *Cronobacter* spp. (% 99.99) olarak tanımlanan G69 kodlu izolat ise 16S rRNA sekans analizi sonucu % 99 olasılıkla *C. muytjensii* olarak belirlenmiştir. Akdari unundan izole edilen G62 kodlu izolat DFI Agarda tipik renkte *Cronobacter* kolonisi oluşturmasına karşın biyokimyasal testler sonucu *E. agglomerans* (% 88.80) olarak belirlenmiş, ancak yapılan sekans analizi sonucu bakterinin *C. sakazakii* (% 100) olduğu saptanmıştır.

Cronobacter spp. α -glucosidase pozitif olup, *Cronobacter* spp.'nin hassas tespiti için kromojenik bir besiyeri olan DFI Agar, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranoside (X α Glc) kullanılarak tespit edilen α -glukosidaz aktivitesine dayanmaktadır. Bu özellik *Cronobacter* spp.'yi izole etmek için geliştirilmiş DFI Agar gibi kromojenik besiyerlerinde diferansiyel reaksiyon için temel oluşturmaktadır. Bakteri, α -glucosidase aktivitesi sonucu TSA besiyerinde de sarı renkli koloni oluşturur (Şekil 4.3). Ancak, α -glucosidase aktivitesi yalnızca *Cronobacter* spp. ile sınırlı değildir. Yapılan bir çalışmada *Cronobacter* spp. dışında *E. vulneris*, *Pantotea* spp. ve *C. koseri*'nin de DFI Agarda mavi-yeşil renkli tipik koloniler oluşturduğu belirlenmiştir (Iversen vd. 2004b). Bebek ek gıdasından izole edilen G77 kodlu izolat bu bilgiyi doğrular nitelikte reaksiyon vermiştir. G77 kodlu izolat DFI Agarda tipik renkte koloni oluşturmasına karşın biyokimyasal testler sonucunda *E. agglomerans* (% 99.99) olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde sekans analizi sonucunda bakteri, *Enterobacteriaceae bacterium* (% 99) olarak belirlenmiş ve herhangi bir cinse dâhil edilememiştir (Çizelge 4.5).

Sekans dizilerine göre tür tayini yapılan *Cronobacter* izolatlarının akrabalık dereceleri şekil 4.4'de verilmiştir. Diziler, Clustal W programı ile hizalanıp Neighbor-joining yöntemi kullanılarak filogenetik ağacı çizilmiştir. Ağaç çizimi sırasında bootstrap değeri 2000 olarak seçilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Tanısı yapılan *Cronobacter* izolatları ile referans bakterilerin 16S rRNA dizileri temel alınarak oluşturulan filogenetik ağaç (Bootstrap 2000)

Cronobacter cinsine ait bazı türlerin akrabalık derecelerini gösteren filogenetik ağaca göre 17 izolattan 15'i *C. sakazakii* türüyle aynı grup altında toplanırken diğer 2 izolat (G69 ve G77) *C. muytjensii* ile aynı dalı paylaşmaktadır.

Cronobacter türleri arasındaki farklılıkların belirlenmesi ve aynı zamanda epidemiyolojik çalışmalara katkı sağlamak amacıyla son dönemde *Cronobacter* izolatlarının genotipik ve fenotipik karakterizasyonu üzerine yapılan araştırmalar yoğunluk kazanmıştır (El-Sharoud vd. 2009, Jaradat vd. 2009, Terragno vd. 2009, Kucerova vd. 2010, Miled-Bennour vd. 2010, Turcovsky vd. 2011).

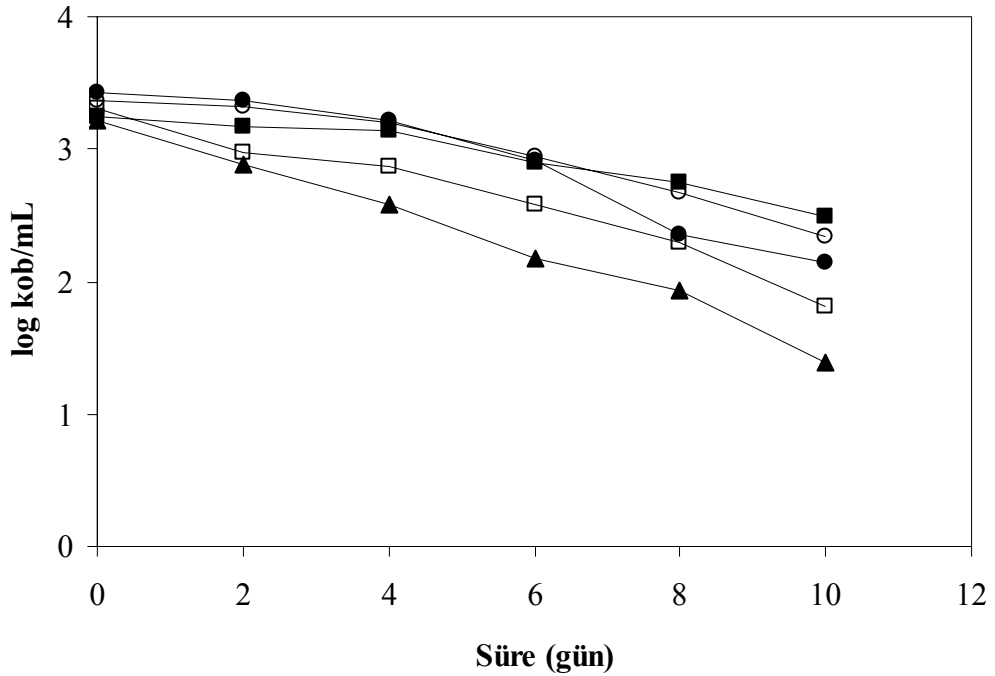
Miled-Bennour vd. (2010), bebek maması, bebek maması üretim alanları ve klinik örnekler gibi farklı kaynaklardan izole edilen *Cronobacter* spp. izolatlarını PFGE, otomatize ribotyping ve 16S rRNA sekans analizi yöntemlerini kullanarak tür düzeyinde belirlemişlerdir. Yapılan başka bir araştırmada ise bebek gıdaları ve üretim alanlarından izole edilen 64 izolattan 13'ü (% 20) 16S rRNA sekans analizi sonucu *C. sakazakii* olarak tanımlanmıştır (Cawthorn vd. 2008).

Jaradat vd. (2009) *Cronobacter* türleri arasındaki fenotipik farklılıklar nedeniyle, yalnızca tek bir yöntemin ya da *Cronobacter* türlerine özgü tek bir primerin kullanılması ile gerçekleştirilen bakteri identifikasyonunun yeterli olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar gıda ve çevresel örneklerden izole ettikleri olası 56 *Cronobacter* spp. izolatının identifikasyonunda; farklı kromojenik besiyerleri (α -MUG, DFI ve ESPM), biyokimyasal testler (API 20E) ve moleküler teknikleri (ITS bölgesi, 16S rRNA, *zpx*, *gluA*, *gluB* ve *ompA* hedef genlerine yönelik PCR analizleri ve 16S rRNA sekans analizi) karşılaştırmalı olarak test etmişlerdir. API 20E kiti ile olası 56 *Cronobacter* spp. izolatından 42'si (% 75) oldukça yüksek identifikasyon oranı ile (% 80-99) *Cronobacter* olarak belirlenirken, 16S rRNA sekans analizi sonucu 42 izolatın yalnızca 29'u *Cronobacter* spp. olarak tanımlanmıştır. *Cronobacter* izolatlarının tanımlanmasında 16S rRNA sekans analizinin ayırt edici gücünün daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Daha önce yapılan araştırmalarda da API 20E identifikasyon kitinin sınırlı sayıda biyokimyasal test içermesi nedeniyle *Cronobacter* spp. tanımlanmasında sahte negatif sonuçlara yol açabildiği bildirilmiştir (Iversen 2004c, 2007).

4.3 *C. sakazakii* Suşlarının Farklı Sıcaklık Koşullarında Gelişimi

C. sakazakii suşlarının farklı sıcaklık koşullarında (4 °C, 10 °C, 20 °C ve 30 °C) gelişimine ilişkin grafikler sırasıyla şekil 4.5 - 4.8’de verilmiştir. *C. sakazakii* suşlarının 4 °C, 10 °C, 20 °C ve 30 °C’da gelişimine ilişkin sayısal veriler ise Ek 2’de sunulmuştur.

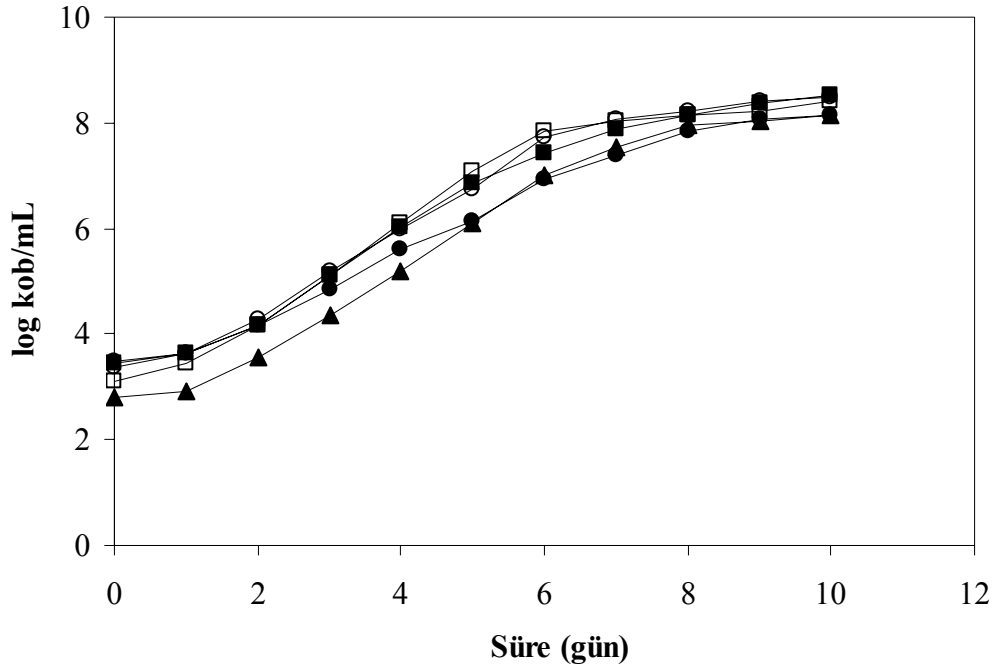
Araştırma sonuçları incelendiğinde, analize alınan *C. sakazakii* suşlarının rekonstitüe bebek mamasında 4 °C’da gelişim göstermediği belirlenmiş ve 10 günlük depolama süresi boyunca bakteri sayılarında 0.74-1.83 logaritmik birim düzeyinde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.5, Ek 2). 4 °C’da depolamada soğuğa en duyarlı suşun *C. mytjensii* ATCC 51329 olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Nazarowec-White ve Farber (1997b) tarafından yapılan araştırmada *Cronobacter* spp. suşlarının minimum gelişme sıcaklığının 5.5-8 °C olduğu; suşların 4 °C’da üremediği ve bu sıcaklıkta depolama süresi boyunca canlılıklarını kaybettikleri bildirilmiştir.



G1 (●), G17 (○), G40 (□), G73 (■), *C. mytjensii* ATCC 51329 (▲)

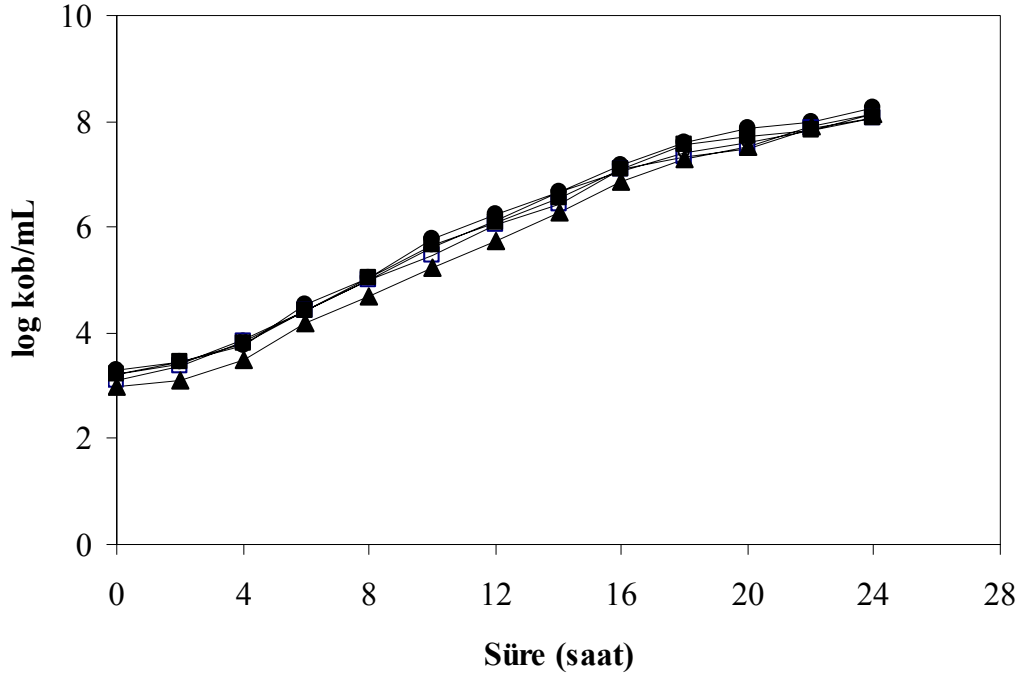
Şekil 4.5 *C. sakazakii* suşlarının 4 °C’deki gelişimi

C. sakazakii suşlarının tümü 10 °C'da gelişim göstermiştir (Şekil 4.6). 10 günlük depolama süresince bakteri sayısında ~ 5 logaritmik birim artış gerçekleşmiştir (Ek 2). Yapılan araştırmalar, birçok ev tipi buzdolabının 7-10 °C sıcaklık aralığında çalıştığını ve bu sıcaklığın *Cronobacter* spp.'nin gelişimi için uygun ortam sağladığını göstermiştir (Nazarowec-White ve Farber 1997b, Iversen 2004a, Lenati vd. 2008). Kindle vd. (1996), *Cronobacter* spp. ve *K. pneumoniae*'nin rekonstitüe bebek mamasında test edilen diğer mikroorganizmalara göre (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *M. terrae* ve *C. albicans*) daha hızlı geliştiklerini tespit etmişlerdir. Bu durum göz önüne alındığında, hazırlanmış bebek mamasının ev tipi buzdolabı sıcaklığında 24 saatten daha uzun süre bekletilmesi bebek sağlığı açısından risk oluşturabileceği düşünülmektedir.



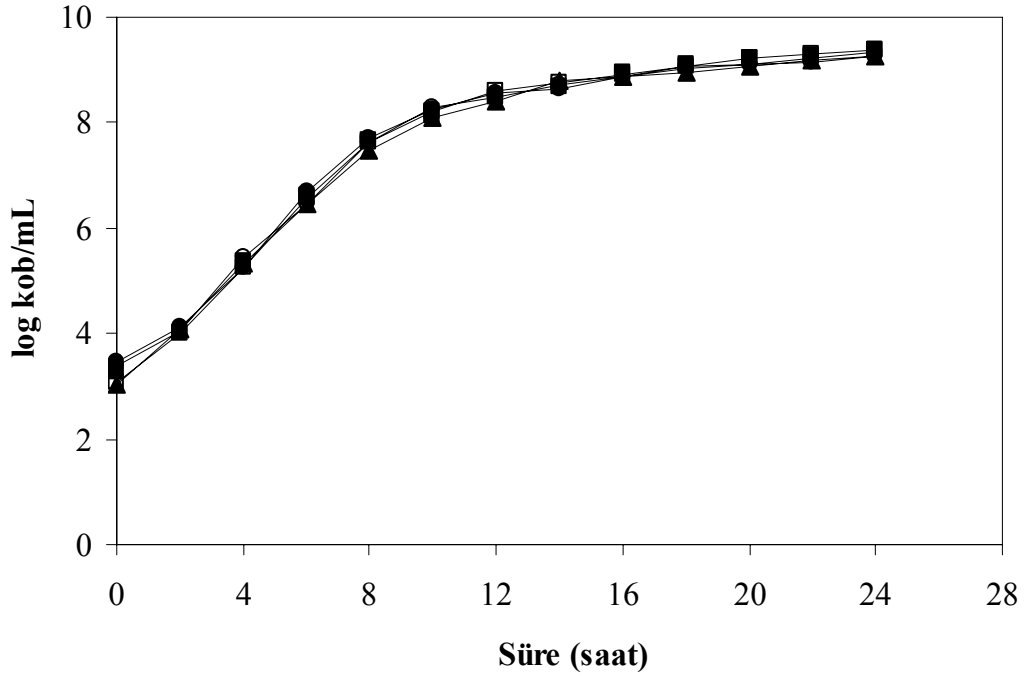
G1 (●), G17 (○), G40 (□), G73 (■), *C. muytjensii* ATCC 51329 (▲)

Şekil 4.6 *C. sakazakii* suşlarının 10 °C'daki gelişimi



G1 (●), G17 (○), G40 (□), G73 (■), *C. mytjensii* ATCC 51329 (▲)

Şekil 4.7 *C. sakazakii* suşlarının 20 °C'daki gelişimi



G1 (●), G17 (○), G40 (□), G73 (■), *C. mytjensii* ATCC 51329 (▲)

Şekil 4.8 *C. sakazakii* suşlarının 30 °C'daki gelişimi

Cronobacter spp.'nin gelişme sıcaklığı aralığı Farmer vd. (1980) tarafından 57 suşta araştırılmıştır. Buna göre, 4 ve 50 °C'da gelişme olmazken, suşların çoğu 47 °C'da gelişim göstermiştir. Iversen vd. (2004a), altı klinik ve gıda suşunun 6-45 °C arasında ve en iyi 37-43 °C'da geliştiğini belirlemişlerdir. Yapılan başka bir araştırmada, bakterinin rekonstitüe bebek mamasında 8-47 °C'da geliştiği tespit edilmiştir (Kandhai vd. 2006). Oasili vd. (2009b), *Cronobacter* türlerinin 4 °C'da bebek maması ortamında gelişim göstermediğini, buna karşın 20-45 °C sıcaklıkta depolamanın ilk 2 saatinde *Cronobacter* sayısında belirlenebilir bir artış olduğunu saptamışlardır. Araştırmamızda incelenen tüm suşlarda 20 °C'da depolamanın ilk 6 saatinde başlangıç sayısına göre ortalama 1.23 logaritmik birim artış gerçekleşirken, 30 °C'da depolamanın ilk 6 saatinde ortalama 3.32 logaritmik birim bir artış belirlenmiştir (Ek 2). *C. sakazakii* suşlarının 30 °C'da gelişme hızının 20 °C'a kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır.

4.4 *C. sakazakii* Suşlarının Jenerasyon Süreleri

C. sakazakii suşlarının 10 °C, 20 °C ve 30 °C'da jenerasyon süreleri çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 *C. sakazakii* suşlarının jenerasyon süreleri¹

Sıcaklık (°C)	Jenerasyon süresi (saat)				
	G1	G17	G40	G73	ATCC 51329 ²
10	11.13±0.45 ^{Aa}	8.83±0.14 ^{Abc}	8.17±0.03 ^{Ac}	9.55±0.32 ^{Ab}	8.86±0.11 ^{Abc}
20	1.06±0.01 ^{Bb}	1.13±0.01 ^{Ba}	1.11±0.01 ^{Ba}	1.10±0.01 ^{Ba}	1.07±0.02 ^{Bb}
30	0.51±0.01 ^{Cb}	0.49±0.01 ^{Cb}	0.50±0.01 ^{Cb}	0.49±0.01 ^{Cb}	0.53±0.01 ^{Ca}

¹: Aynı satırdaki farklı harfler (a-c) ve aynı sütundaki farklı harfler (A-C) ile gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Jenerasyon süreleri aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir.

²: *C. muytjensii* ATCC 51329

G1, G17, G40, G73 ve kontrol suşlarının logaritmik fazda 10 °C, 20 °C ve 30 °C'da ortalama jenerasyon sürelerinin sırasıyla 9.31±1.13 (8.17-11.13), 1.09±0.03 (1.06-1.13) ve 0.51±0.02 (0.49-0.53) saat olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık artışına bağlı olarak

gelişme hızının arttığı ve suşların jenerasyon sürelerinin kısaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). Suş bazında incelendiğinde, 10 °C’da en kısa jenerasyon süresine sahip suşun G40 olduğu, 20 °C’da ise G1 ve *C. muytjensii* ATCC 51329’un jenerasyon sürelerinin diğer suşlara kıyasla daha kısa olduğu tespit edilmiştir. 30 °C’da *C. muytjensii* ATCC 51329 dışında analiz edilen *C. sakazakii* suşlarının jenerasyon süreleri arasında istatistik açıdan bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Cronobacter spp. için jenerasyon ve lag sürelerinin, diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri için rapor edilen sürelerle yakın olduğu, fakat süt ürünlerinde bulunan diğer organizmalardan daha kısa olduğu bildirilmiştir. Bakterinin 10 °C ve 23 °C’da lag sürelerinin sırasıyla 2-3 saat ve 19-47 saat aralığında olduğu belirlenmiştir (Nazarowec-White ve Farber 1997b). *Cronobacter* spp. jenerasyon süresinin 10 °C’da muhafaza edilmiş bebek mamasında yaklaşık 10 saat olduğu buna karşın oda sıcaklığında (21 °C) bu sürenin yalnızca 75 dakika olduğu bildirilmiştir (Iversen ve Forsythe 2003). Yapılan başka bir araştırmada ise bakterinin ortalama jenerasyon süresinin 10 °C’da 4.98 saat, 23 °C’da ise 40 dakika olduğu belirlenmiştir. Başlangıçta 1 kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. içeren, oda sıcaklığında muhafaza edilmiş bebek mamasında bakteri sayısının 7 log kob/mL’ye ulaşması için en az 10 saatlik bir sürenin gerekli olduğu ve mamanın 35-37 °C’da tutulduğu takdirde bu sürenin daha da kısa olacağı belirtilmiştir (Nazarowec-White ve Farber 1997b). Iversen vd. (2004a) bebek mamasında altı klinik ve gıda suşunun gelişme hızı üzerine yaptıkları araştırmada, jenerasyon süresinin 37 °C’da 19-21 dakika aralığında olduğunu belirlemişlerdir.

Araştırma kapsamında elde edilen jenerasyon süreleri, Iversen ve Forsythe (2003) ve Iversen vd. (2004a) tarafından bildirilen değerlere yakın bulunurken, Nazarowec-White ve Farber (1997b)’in elde ettiği değerlere göre daha yüksek bulunmuştur. Kullanılan suş ve gelişme ortamının jenerasyon sürelerinde görülen farklılıkların nedeni olacağı açıktır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *C. sakazakii*’nin hızlı gelişiminin, yeni doğmuş bebeklerde hastaneden kaynaklanan ve patojenle ilgili enfeksiyonların nedeni olabileceği beklenebilir.

4.5 *C. sakazakii* Suşlarının Farklı pH Koşullarında Gelişimi

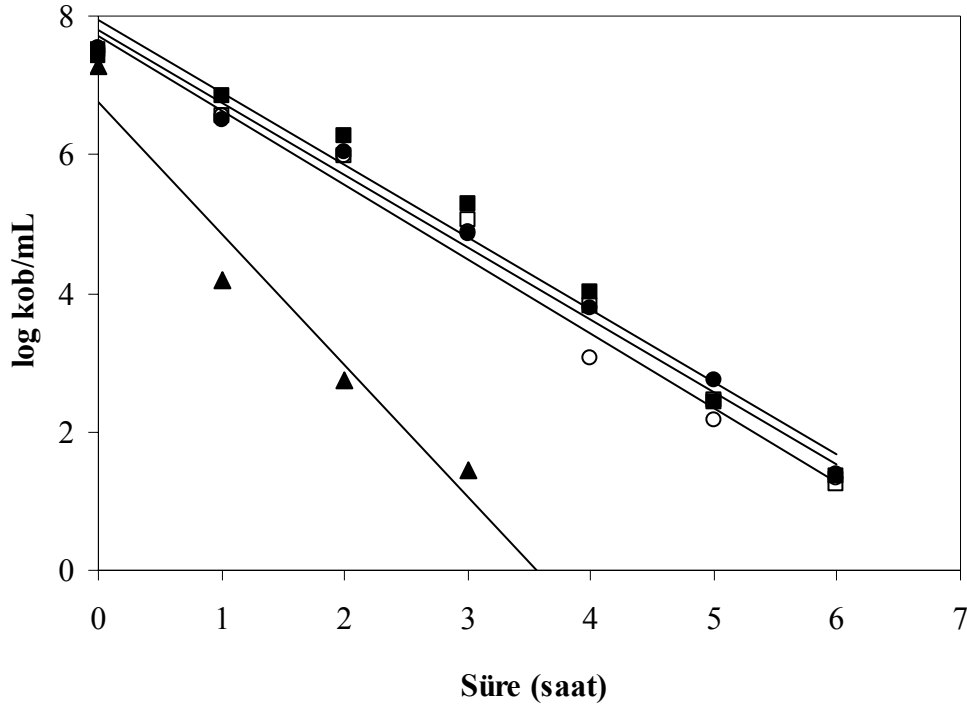
C. sakazakii suşlarının pH 3.5’de gelişim durumları çizelge 4.7 ve şekil 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.7 *C. sakazakii* suşlarının pH 3.5’deki gelişimi (log kob/mL)

Süre (saat)	G1	G17	G40	G73	ATCC 51329 ¹
0	7.54±0.05	7.48±0.02	7.52±0.03	7.43±0.01	7.29±0.03
1	6.51±0.07	6.54±0.01	6.57±0.03	6.85±0.02	4.18±0.07
2	6.04±0.04	5.98±0.02	5.99±0.04	6.27±0.07	2.73±0.05
3	4.84±0.06	4.87±0.03	5.07±0.07	5.28±0.04	1.45±0.15
4	3.79±0.03	3.05±0.02	3.83±0.02	4.02±0.02	<1
5	2.75±0.07	2.17±0.06	2.41±0.05	2.43±0.03	<1
6	1.39±0.09	1.32±0.02	1.24±0.06	1.35±0.05	<1
12	<1	<1	<1	<1	<1

¹: *C. mytjensii* ATCC 51329

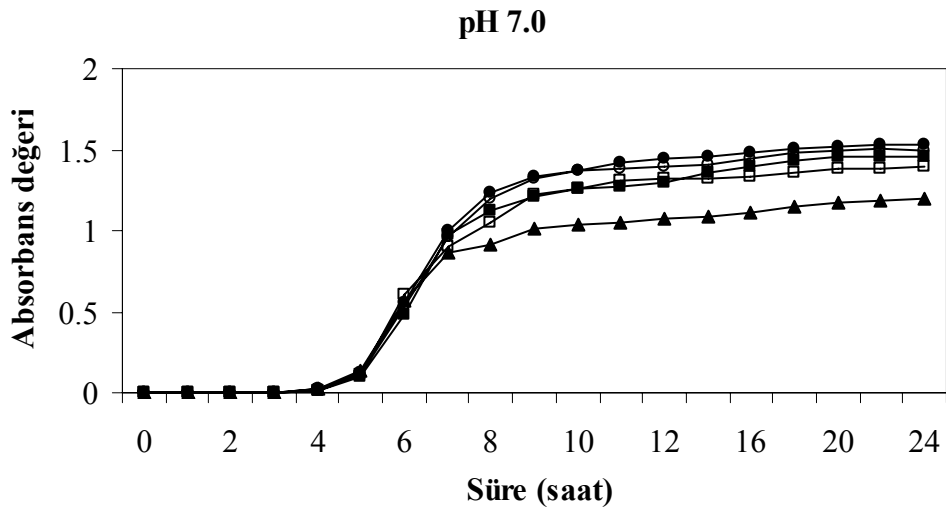
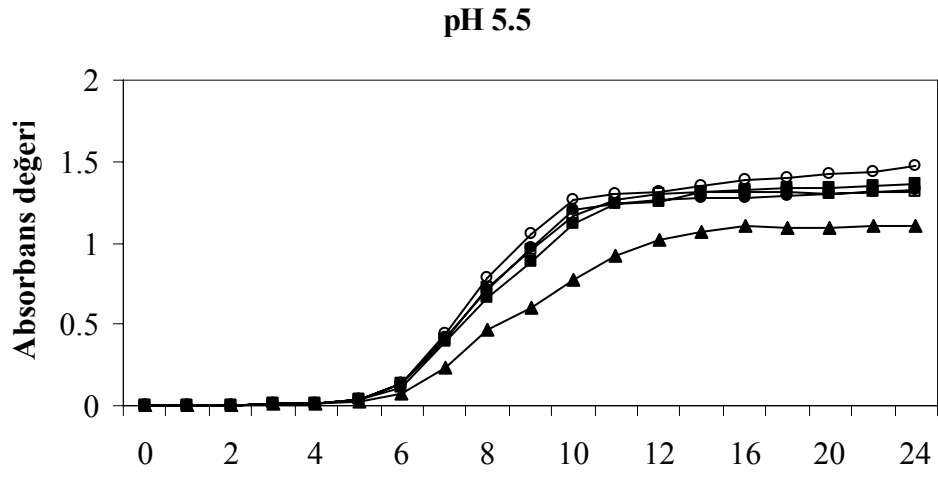
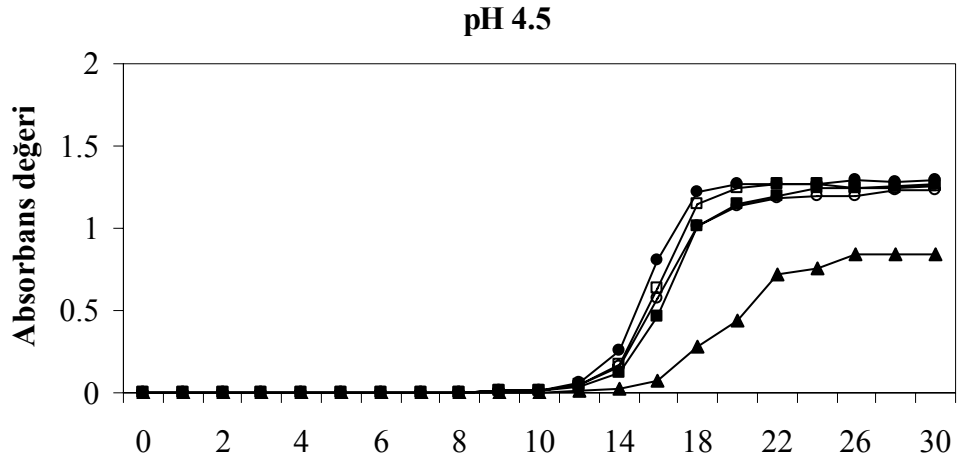
Çizelge incelendiğinde, *C. mytjensii* ATCC 51329 standart suşu dışında analiz edilen diğer dört suşun 6 saat boyunca pH 3.5’de canlı kaldıkları belirlenmiştir. *C. mytjensii* ATCC 51329 suşu 4. saatin sonunda tespit edilebilir limitin altında bir değere indirgenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda asit toleransı en düşük suşun *C. mytjensii* ATCC 51329 olduğu saptanmıştır. Edelson-Mammel vd. (2006), HCl ile pH 3.0 ve 3.5’e ayarlanmış TSB besiyerinde 12 *Cronobacter* spp. suşunun canlı kalma düzeylerini incelemişlerdir. On iki suştan onunun, 37 °C’da pH 3.5’de 5 saatten fazla bir sürede 1 logaritmadan az düşüş gösterdiği, pH 3.0’da TSB’deki indirgemenin 4.9- >6.3 log kob/mL düzeyinde olduğu belirtilmiştir. Bulgular karşılaştırıldığında incelenen suşların asit direncinin Edelson-Mammel vd. (2006) tarafından incelenen suşlara kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun suş farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



G1 (●), G17 (○), G40 (□), G73 (■), *C. muytjensii* ATCC 51329 (▲)

Şekil 4.9 *C. sakazakii* suşlarının pH 3.5’deki gelişimi

C. sakazakii suşlarının pH 4.5, pH 5.5 ve pH 7.0’deki gelişim eğrileri şekil 4.10’da verilmiştir. Gelişim eğrileri incelendiğinde, *C. sakazakii* suşlarının analiz edilen tüm pH değerlerinde (pH 4.5, 5.5 ve 7.0) gelişim gösterdiği ancak suşların lag sürelerinin asit pH değerlerinde (pH 4.5, 5.5) uzadığı görülmektedir. *Cronobacter* spp.’nin gelişebildiği en düşük pH değerinin 37 °C’da pH 3.9-4.1 olduğu bildirilmiştir (Dancer vd. 2009). Buna karşın Richards vd. (2005) tarafından yapılan araştırmada, elma suyu ile rekonstitüe edilen pirinç unlarında (pH 4.39) *Cronobacter* spp.’nin gelişemediği tespit edilmiştir. Yapılan başka bir araştırmada ise *Cronobacter* spp. suşlarının 25 °C’da elma (pH 3.9) ve çilek (pH 3.6) sularında gelişim gösteremediği, domates (pH 4.4), karpuz (pH 5.0) ve kavun (pH 6.8) sularında gelişim gösterdiği belirlenmiştir (Kim vd. 2005). Araştırma bulguları doğrultusunda genel olarak *C. sakazakii* suşlarının asit pH’ya önemli ölçüde direnç gösterdiği ve pH 4.5 ve üzerindeki pH değerlerinde üreyebildiği söylenebilir.



● G1 ○ G17 □ G40 ■ G73 ▲ C. muytjensii ATCC 51329

Şekil 4.10 *C. sakazakii* suşlarının pH 4.5, pH 5.5 ve pH 7.0'daki gelişim eğrileri

4.6 *C. sakazakii* Suşlarının Termal Dirençleri

C. sakazakii'nin ölüm kinetiği lineer regresyon analizi kullanılarak modellenmiş ve üç sıcaklık (54 °C, 56 °C ve 58 °C) için regresyon eğrilerinin R^2 değerleri >0.95 bulunmuştur. *C. sakazakii* suşlarının 54 °C, 56 °C ve 58 °C'daki *D* ve *z* değerlerine ilişkin veriler çizelge 4.8'de, *C. sakazakii* suşlarının 54 °C, 56 °C ve 58 °C'daki termal inaktivasyonu grafikleri ise sırasıyla şekil 4.11 - 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. *C. sakazakii* suşlarının *D* ve *z* değerleri¹

Sıcaklık (°C)	<i>D</i> değeri (dakika)				
	G1	G17	G40	G73	ATCC 51329 ²
54	6.55±0.18 ^{Ab}	6.62±0.15 ^{Ab}	5.85±0.06 ^{Ac}	12.21±0.3 ^{Aa}	2.96±0.03 ^{Ad}
56	1.54±0.01 ^{Bc}	1.83±0.02 ^{Bb}	1.80±0.03 ^{Bb}	4.27±0.05 ^{Ba}	1.10±0.02 ^{Bd}
58	0.43±0.01 ^{Cb}	0.39±0.01 ^{Cc}	0.32±0.01 ^{Cd}	1.19±0.04 ^{Ca}	0.29±0.01 ^{Ce}
<i>z</i> -değeri (°C)	0.65±0.01 ^c	0.64±0.01 ^c	0,72±0.01 ^b	0.36±0.01 ^d	1.50±0.01 ^a

¹: Aynı satırdaki farklı harfler (a-e) ve aynı sütundaki farklı harfler (A-C) ile gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

²: *C. mytjensii* ATCC 51329

Analize alınan *C. sakazakii* suşlarının farklı sıcaklıklardaki termal dirençlerinin değişkenlik gösterdiği saptanmıştır ($p<0.05$). *D* değerlerinin 54 °C'da 2.96-12.21 dakika, 56 °C'da 1.10-4.27 dakika, 58 °C'da 0.29-1.19 dakika aralığında olduğu belirlenmiştir. *z* değerlerinin ise 0.36-1.50 °C değerleri arasında olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan tüm sıcaklıklarda *C. mytjensii* ATCC 51329'un en düşük termal dirence sahip suş olduğu, en yüksek termal dirence sahip suşun ise G73 kodlu izolat olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). *D* değerlerindeki bu değişimin suş farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. G73 kodlu izolat proses sırasında ısı işlem görmüş bir ürün olan bebek ek gıdasından izole edilmiştir. Buna karşın diğer üç izolat ise herhangi bir ısı işlem uygulanmamış ek gıda bileşenlerinden (buğday unu, buğday irmiği ve çavdar unu) izole edilmiştir. Normal koşullarda *C. sakazakii*'nin toz bebek maması ya da ek gıda üretiminin pastörizasyon aşamasında canlı kalamadığı ancak ürünün pastörizasyon işlemi sonrasında ısıya duyarlı katkıların eklenmesi sırasında kontamine olabileceği

belirtilmektedir. Buna karşın bakterinin üretimin ısı işlem uygulanan sprey kurutma aşamasında canlı kalabildiği belirlenmiştir (Arku vd. 2008). Bu bilgiler doğrultusunda ek gıdadaki *C. sakazakii* varlığı üretim sırasındaki yetersiz pastörizasyon işlemi ya da proses sonrası meydana gelen kontaminasyon ile açıklanabilir.

Yapılan araştırmalarda *Cronobacter* spp.'nin termal direnci konusunda önemli farklılıklar gözlemlense de diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine kıyasla daha yüksek bir termal dirence sahip olduğu ve bu durumun bakterinin bebek mamalarında daha yaygın olmasını açıklayabileceği belirtilmiştir. Termal dirençte görülen bu değişikliklerin *Cronobacter* spp.'nin genetik farklılıklarıyla ilişkili olup olmadığı henüz ortaya konmamıştır (Nazarowec-White ve Farber 1997c, Breeuwer vd. 2003, Iversen vd. 2004a, Edelson-Mammel ve Buchanan 2004, Osaili vd. 2008b, Shaker vd. 2008, Al-Holy vd. 2009, Osaili vd. 2009).

Nazarowec-White ve Farber (1997c) *Cronobacter* spp.'ye ilişkin *D* değerlerini 52-60 °C'da 54.79-2.50 dakika, Edelson-Mammel ve Buchanan (2004) 56-70 °C'da 21.05-0.07 dakika ve Iversen vd. (2004a) 54-62 °C'da 16.4-0.3 dakika olarak bildirmiştir.

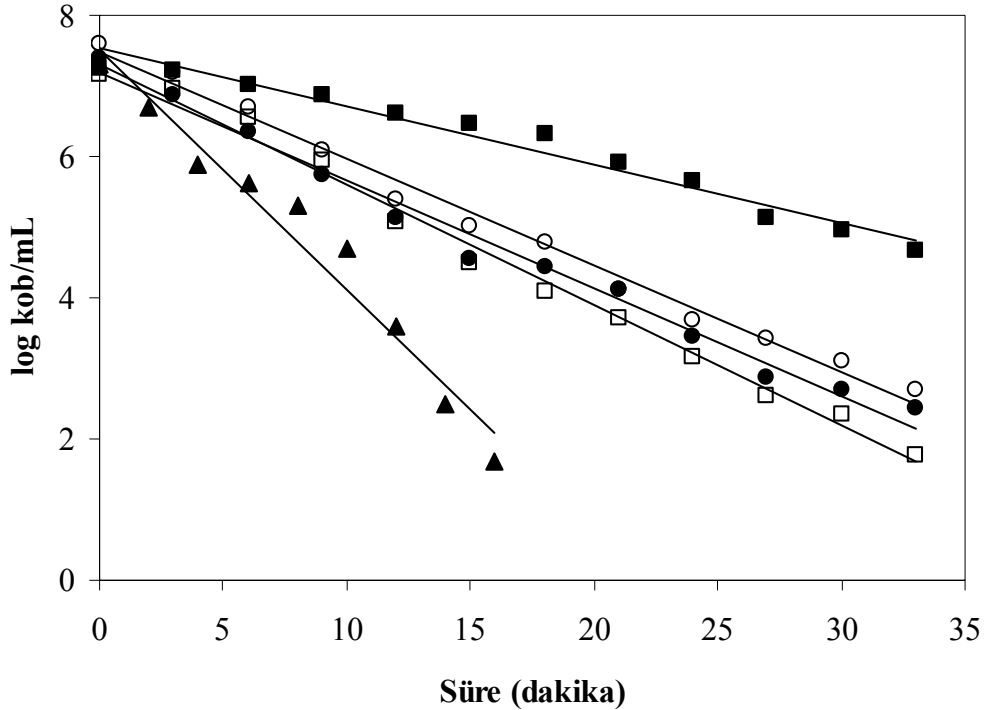
Farklı stres koşullarının (soğutma, ısıtma, kurutma, besin yetersizliği) *Cronobacter* spp. suşlarının termal inaktivasyonuna etkisi konulu bir araştırmada, kurutma ve sıcaklık stres koşullarının *D* değerlerinde önemli bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Stres koşulları uygulanmamış *Cronobacter* spp. suşlarının 52, 54, 56 ve 58 °C'da *D* değerlerinin sırasıyla 15.33, 4.53, 2.00 ve 0.53 dakika olduğu belirlenmiştir (Shaker vd. 2008).

Osaili vd. (2008b), *Cronobacter* spp.'nin termal inaktivasyonu üzerine yaptıkları araştırmada 54-58 °C'da *D* değerlerini 5.34-0.56 dakika aralığında, *z* değerini ise 4.12 °C tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir araştırmada, *C. sakazakii*'nin 52 °C ve 58 °C'da *D* değerlerinin yağlı sütte (22.20-0.68 dakika), yağsız süt (15.87-0.62 dakika) ve düşük yağlı süte (15.30-0.51 dakika) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde laktoz içermeyen bebek formüllerinin (19.57-0.66 dakika) soya proteini içeren bebek

formüllerine (17.22-0.63 dakika) göre daha yüksek *D* değerlerine sahip olduğu saptanmıştır (Osaili vd. 2009).

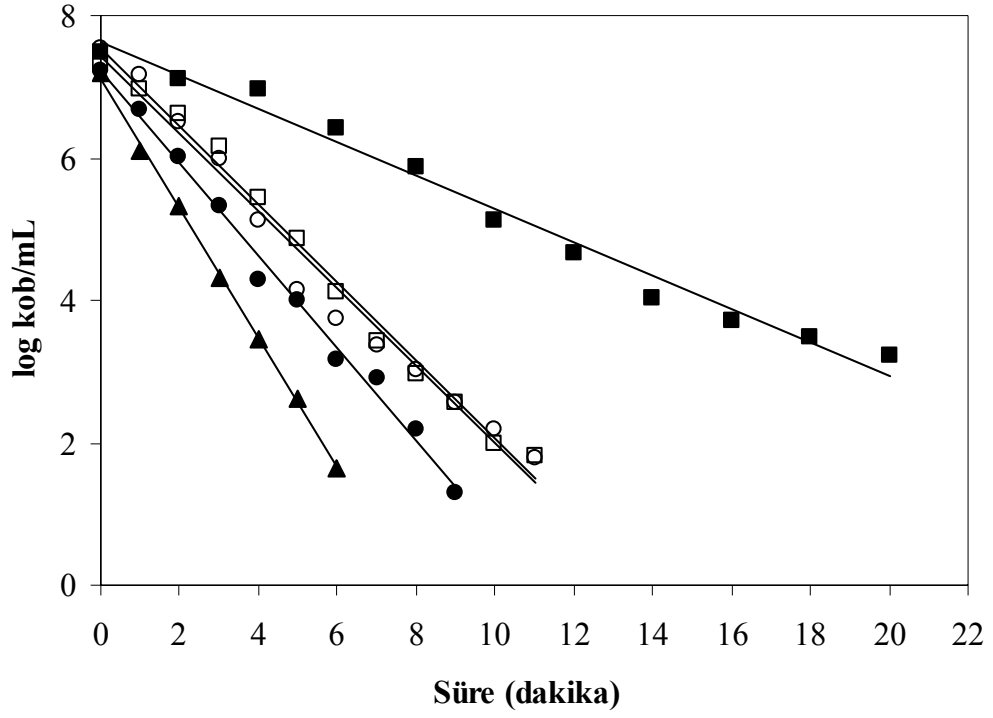
Araştırma kapsamında elde edilen *D* değerleri Nazarowec-White ve Farber (1997c), Edelson-Mammel ve Buchanan (2004) ve Iversen vd. (2004a) tarafından *Cronobacter* spp. için bildiren *D* değerlerine kıyasla düşük bulunurken, Breeuwer vd. (2003), Shaker vd. (2008), Osaili vd. (2008b) ve Osaili vd. (2009) tarafından bildirilen *D* değerleri ile benzerlik göstermektedir. Mikroorganizmaların termal direnci üzerine birçok faktörün etkili olduğu bildirilmiştir. Isıtma ortamının bileşimi özellikle yağ, kuru madde ve şeker içeriğinin mikroorganizmaların termal direncini büyük ölçüde etkilediği belirtilmiştir (Osaili vd. 2009). Ayrıca kullanılan şüşün da *D* değerlerinde görülen farklılıkların nedeni olabileceği düşünülmektedir.

C. sakazakii suşlarının 54 °C, 56 °C ve 58 °C'daki termal inaktivasyon denemesi sonucu elde edilen sayısal veriler Ek 1'de verilmiştir.

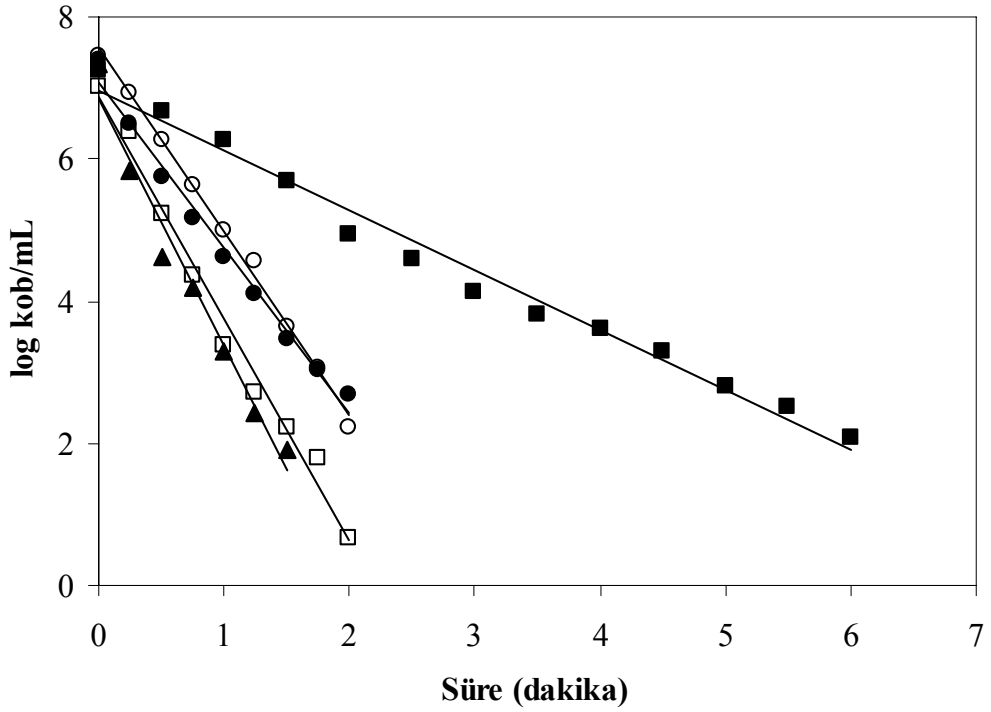


G1 (●), G17 (○), G40 (□), G73 (■), *C. mytjensii* ATCC 51329 (▲)

Şekil 4.11 *C. sakazakii* suşlarının 54 °C'da termal inaktivasyonu



Şekil 4.12 *C. sakazakii* suşlarının 56 °C’da termal inaktivasyonu

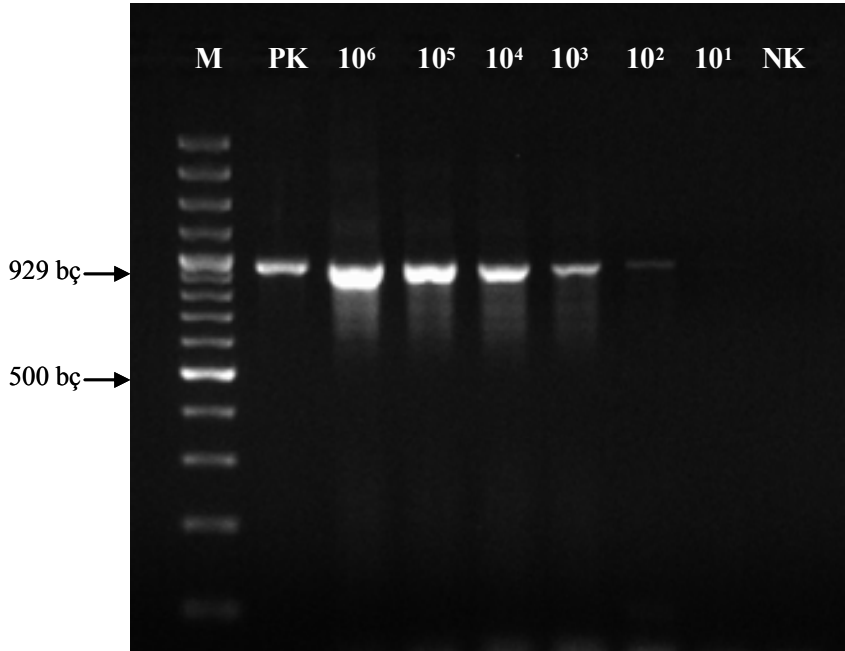


Şekil 4.13 *C. sakazakii* suşlarının 58 °C’da termal inaktivasyonu

4.7 Direkt PCR Yöntemi ile Bebek Mamalarında *Cronobacter* spp. Tespiti

4.7.1 Bebek mamalarından *Cronobacter* spp. tespitinde direkt PCR yönteminin duyarlılığı

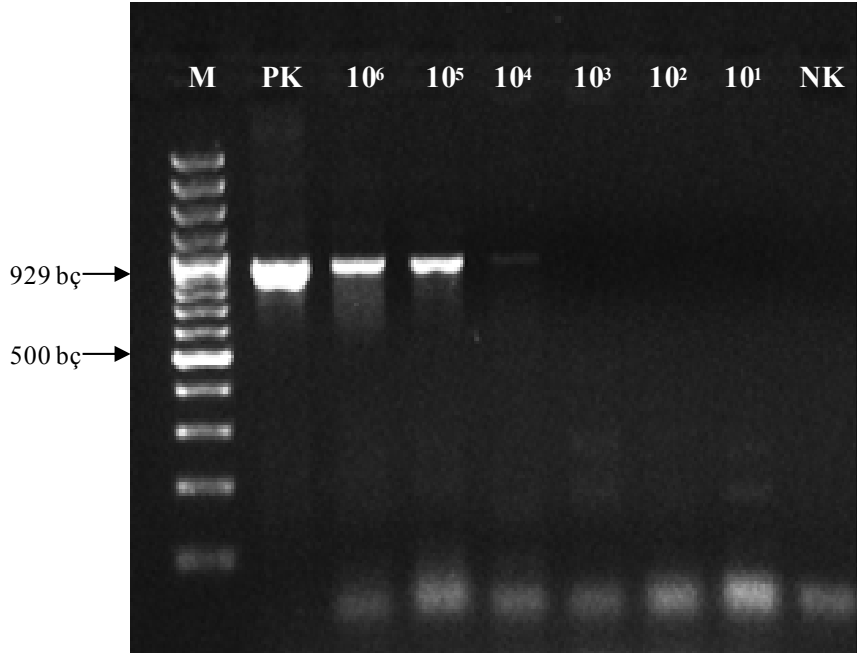
Geri alma çalışmalarında belirli sayıda (10^1 - 10^6 kob/mL) *C. muytjensii* ATCC 51329, bebek maması ortamına katılıp homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra buradan alınan örnekte direkt PCR yöntemi ile hedef bakterinin hangi sayıda geri alınabileceği tespit edilmiştir. Hedef bakterinin tespiti DNA izolasyon kiti ve kaynatma işlemi olmak üzere iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Ön zenginleştirme işlemi uygulanmaksızın DNA izolasyon kiti ile DNA izolasyonu gerçekleştirilen ve ardından PCR uygulanan örneklerin agaroz jel görüntüleri şekil 4.14'te verilmiştir. Bu yöntem ile bebek mamalarında en düşük 10^2 kob/mL düzeyinde izolasyon gerçekleştirilirken, 10^1 kob/mL düzeyinde jelde bant gözlenmemiştir.



Şekil 4.14 Rekonstitüe bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen yöntem)

M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

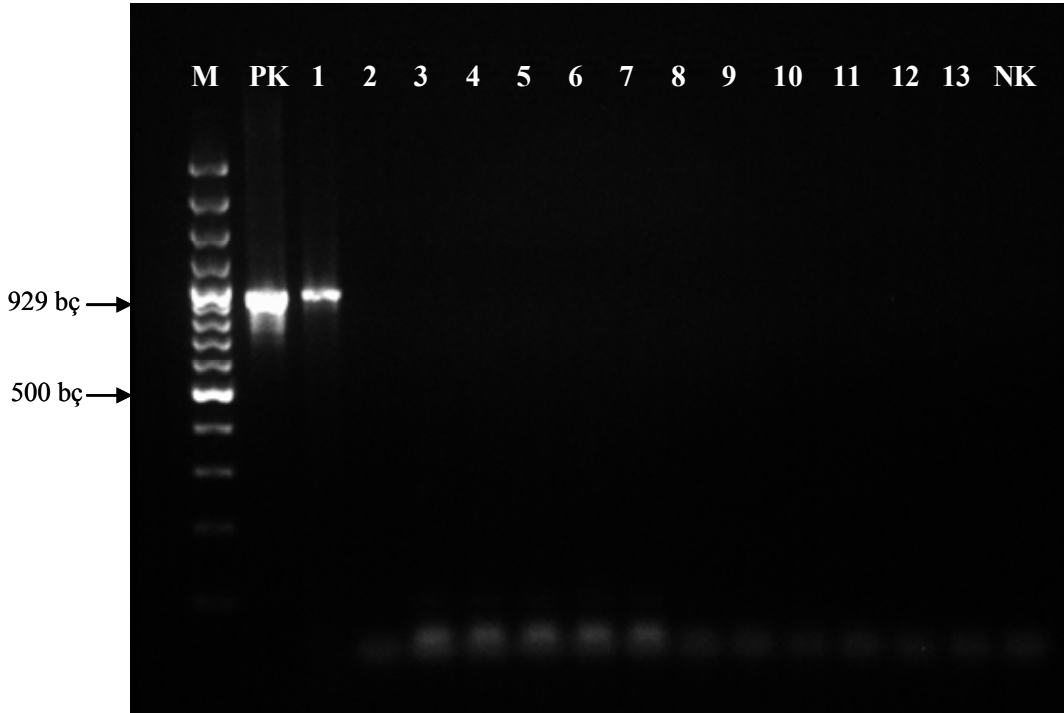
Belirli sayıda *C. muytjensii* ATCC 51329 standart suşu ile kontamine edilmiş bebek mamalarından kaynatma yöntemi ile de DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu örneklerde spesifik primerler kullanılarak PCR analizi yapılmıştır. Bu örneklerle ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü şekil 4.15'te verilmiştir. Uygulanan bu yöntem ile bebek mamalarında *Cronobacter* spp. tespitinde limit değer 10^4 kob/mL olarak belirlenmiştir. 10^1 , 10^2 ve 10^3 kob/mL düzeyinde jelde özgün bant gözlenmemiştir. Sonuçlar incelendiğinde; direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespitinde, DNA izolasyon kiti ile uygulanan yöntemin kaynatma yöntemine göre daha duyarlı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.15 Rekonstitüe bebek mamasından direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (kaynatma yöntemi)

M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

Araştırma kapsamında PCR analizlerinde kullanılan, *Cronobacter* türlerine özgü 16S rRNA gen bölgesinin 929 baz çiftlik DNA fragmentini çoğaltan primerlerin spesifikliğı belirlenmiştir (Şekil 4.16). Bu amaçla *C. muytjensii* ATCC 51329 standart suşu dışında araştırmamız sırasında bebek maması ve ek gıda bileşenlerinden yaygın olarak izole edilen ve tanımlanan bakteriler ile özellikle bebeklerde potansiyel enfeksiyon etkeni bakteriler referans olarak kullanılmıştır. Belirli sayıda (10^6 kob/mL) test bakterileri ile kontamine edilmiş bebek mamasında yapılan direkt PCR sonrasında *C. muytjensii* ATCC 51329 ve sekans analizi sonucu *C. sakazakii* olarak tanımlanan G73 kodlu suş dışında diğer bakteriler için jelde bant gözlenmemiş ve kullandığımız primerlerin *Cronobacter* spp. için spesifik olduğu belirlenmiştir.



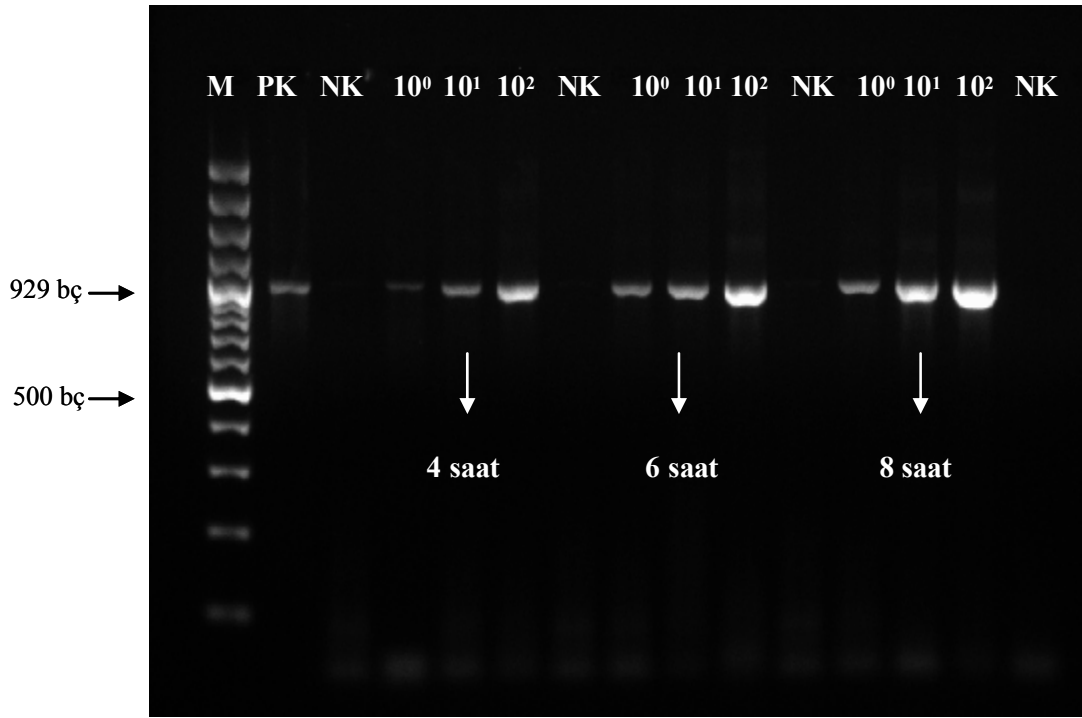
Şekil 4.16 *Cronobacter* türlerine özgü primerlerin spesifikliğinin tespiti

M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), 1: *C. sakazakii* (G73), 2: *E. cloacae*, 3: *E. aerogenes*, 4: *E. coli*, 5: *K. pneumoniae*, 6: *K. oxytoca*, 7: *A. baumannii* 8: *C. freundii*, 9: *S. Enteritidis*, 10: *P. aeruginosa*, 11: *B. cereus*, 12: *S. aureus*, 13: *L. monocytogenes*, NK: Negatif Kontrol

4.7.2 Direkt PCR yöntemi ile bebek mamalarından ön zenginleştirme işlemi ile *Cronobacter* spp. tespiti

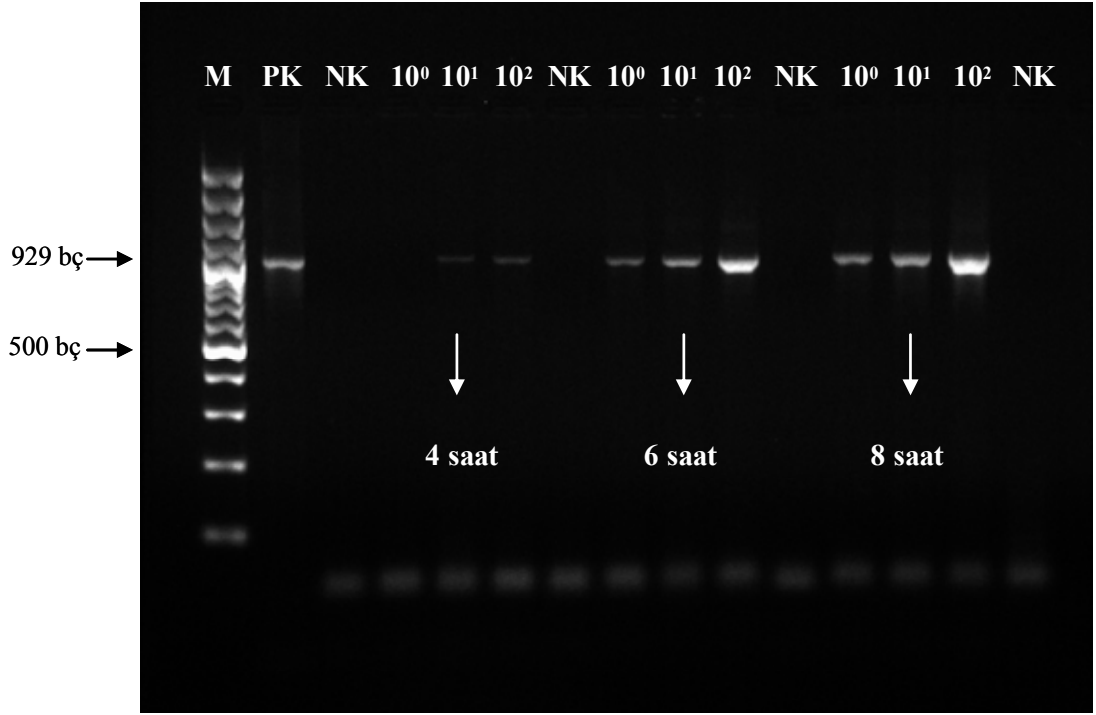
Araştırma kapsamında bebek maması örneklerinde, selektif olmayan ön zenginleştirme ortamında (rekonstitüe bebek maması) 37 °C’da 4, 6 ve 8 saatlik inkübasyon süreleri kullanılarak yaklaşık 10^0 , 10^1 ve 10^2 kob/mL seviyesindeki hedef bakterinin direkt PCR yöntemi ile belirlenmesi için gerekli en kısa ön zenginleştirme süresi saptanmıştır.

Belirli sayıda bakteri ile kontamine edilmiş ve ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş bebek maması örneklerinden DNA izolasyon kiti ve kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış, ardından PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu örneklere ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri şekil 4.17 ve şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.17 Rekonstitüe bebek mamasından ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen yöntem)

M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA’sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol



Şekil 4.18 Rekonstitüe bebek mamasından ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (kaynatma yöntemi)

M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

Kontamine edilmiş bebek mamalarında yalnızca 4 saatlik ön zenginleştirme işleminin uygulanması ile 1 kob/mL seviyesinde *Cronobacter* izole edilebilmiştir (Şekil 4.17). Buna karşın kaynatma yöntemi uygulanarak gerçekleştirilen direkt PCR yöntemi ile 4 saatlik ön zenginleştirme işlemi sonrasında 10 kob/mL seviyesinde *Cronobacter* belirlenebilirken, 6 saatlik ön zenginleştirme sonrasında *Cronobacter* tespitinde limit değer 1 kob/mL olarak saptanmıştır (Şekil 4.18). Ön zenginleştirme işlemi sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* tespitinde, DNA izolasyon kiti ile gerçekleştirilen yöntemin (4 saatlik bir ön zenginleştirme ile 1 kob/mL duyarlılıkta tespit) kaynatma yöntemine göre daha duyarlı olduğu ve bu yöntemde daha kısa bir ön zenginleştirme süresine ihtiyaç duyulduğu saptanmıştır. Buna karşın analiz maliyeti göz önüne alındığında 6 saatlik bir ön zenginleştirme ile kaynatma yönteminin (1 kob/mL duyarlılıkta) daha avantajlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Klasik kültürel yöntemle *Cronobacter* spp. izolasyonu ve biyokimyasal identifikasyonu için 5 günlük bir zaman dilimine ihtiyaç duyulmaktadır. Bebek mamasından *Cronobacter* spp. tespitinde (1 kob/mL düzeyinde) uygulanan direkt PCR yöntemi ile kit kullanılarak yalnızca 10 saat, kaynatma yöntemi ile ise yalnızca 12 saat sonunda sonuç alınabilmektedir. Biyokimyasal izolasyon ve tanı yöntemleri kullanılarak yapılan kültüre dayalı yöntemlerin bazı dezavantajları vardır. Bunlar; izolasyon ve tanı için uzun zaman gereksinimi, tür düzeyinde kesin tanı yapılmasında karşılaşılan yanlış negatif sonuçlar ve belki de en önemlisi hasar görmüş mikroorganizmaların kültürel yöntemlerle geliştirilmesinde meydana gelen zorluklardır. Bu ve benzeri nedenlerle gıdalardan patojen mikroorganizmaların aranmasında direkt PCR yönteminin kullanılması son zamanlarda üzerinde çok durulan bir konudur. Klinik mikrobiyolojide patojenlerin izolasyonunda PCR temeline dayalı yöntemler patojen aranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin diğer bazı avantajları da canlı fakat kültürü yapılamayan (VBNC) mikroorganizmaların da belirlenmesine olanak sağlamakta, aynı anda çok sayıda örnek ile çalışılmasına olanak tanımaktadır. Yüksek duyarlılık ve seçicilik gibi avantajlarının yanı sıra, hızlı ve otomasyona uyum sağlayan bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Çakır ve Çakmakçı 2005).

Cronobacter spp. tespitinde PCR yönteminin, kültürel belirleme yöntemlerine göre etkinliği, birçok araştırmacı tarafından karşılaştırmalı olarak araştırılmış ve PCR yönteminin, kültürel belirleme yöntemlerine oranla daha hızlı ve daha duyarlılıkta sonuç verdiği bildirilmiştir (Liu vd. 2006, Mohan Nair ve Venkitanarayanan 2006, Gutierrez-Rojo ve Torres-Chavollo 2007, Krascenicsova ve Trncikova 2008, Zhou vd. 2008, Ye vd. 2008). Gutierrez-Rojo ve Torres-Chavollo (2007) tarafından yapılan araştırmada, direkt PCR yöntemi ile 10^5 kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. tespit edilirken, 8 saatlik selektif zenginleştirme ile yapılan PCR sonucunda 1 kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. saptanmıştır. Araştırmacılar tarafından 50 bebek maması örneği klasik yöntem ve direkt PCR yöntemi ile analiz edilmiş ve analiz sonrasında PCR yöntemi ile 39 örnekte *Cronobacter* spp. pozitif olarak doğrulanırken, klasik yöntemde 31 örnekte pozitif olarak doğrulanmıştır. 16S-23S rDNA genini kodlayan “internal transcrib spacer” gen bölgelerinin hedef alınarak yapılan başka bir araştırmada, TaqMan Prob ve Sybr Green olmak üzere iki farklı real-time PCR tekniği ile *Cronobacter* spp. toz bebek

maması örneklerinde 1.1 kob/100 g seviyesinde tespit edilebilmiştir (Liu vd. 2006). Mohan Nair ve Venkitanarayanan (2006), araştırmalarında bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile 10^3 kob/mL düzeyinde ve 8 saatlik zenginleştirme sonrasında 0.1 kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. belirlemişlerdir. Yapılan başka bir araştırmada real-time PCR ile *Cronobacter* spp.'nin makro-moleküler (MMS) operon sentezini hedefleyen primerler ve TaqMan prob kullanılarak, sulandırılmış bebek mamalarında zenginleştirme işlemi yapılmaksızın 100 kob/mL, 24 saat zenginleştirme sonrasında ise 0.6 kob/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. belirlenebilmiştir (Seo ve Brackett 2005).

5. SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Araştırmada 200 adet bebek maması, bebek ek gıdası ve bileşenleri incelenmiştir. Başlangıç ve devam bebek mamalarında *C. sakazakii* belirlenmezken, koliform ve *Enterobacteriaceae* sayılarının 1 log kob/g'dan az olduğu tespit edilmiştir. Ek gıdalar içerisinde yalnızca tahıl bazlı ek gıdada *C. sakazakii* belirlenmiştir. Bebek gıdalarında hammadde olarak kullanılan tahıl ürünlerinin ise % 82.9'unun *Enterobacteriaceae* ile kontamine olduğu, bunlardan % 60'nın *C. sakazakii* içerdiği saptanmıştır.

2. Biyokimyasal identifikasyon sonucunda analize alınan örneklerde *C. sakazakii* dışında yaygın olarak tanımlanan bakteriler, *E. cloacae*, *E. agglomerans* ve *K. pneumoniae* olarak belirlenmiştir. Microbact 24E ile gerçekleştirilen biyokimyasal identifikasyon sonuçlarının, iki izolat dışında 16S rRNA sekans analizi sonuçları ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Biyokimyasal testlerle *Cronobacter* spp. olarak tanısı yapılan izolatlar, 16S rRNA sekans analizi sonucunda *C. sakazakii* ve *C. muytjensii* olarak belirlenmiştir.

3. *C. sakazakii* suşlarının rekonstitüe bebek mamasında 4 °C'da gelişim göstermediği ve depolama süresince bakteri sayılarında azalma olduğu gözlenmiştir. Suşların logaritmik fazda ortalama jenerasyon sürelerinin 10 °C, 20 °C ve 30 °C'da sırasıyla 9.31 saat, 1.09 saat ve 0.51 saat olduğu belirlenmiştir. *C. sakazakii*'nin hızlı gelişimi yeni doğmuş bebeklerde patojenle ilgili olası enfeksiyonların nedeni olabilir. Hazırlanan bebek mamalarının oda sıcaklığında uzun süre bekletilmesi bebek sağlığı açısından risk oluşturabilmektedir. Bu nedenle, bebek maması tüketim öncesinde 4 °C'da muhafaza edilmeli ve 24 saat içinde kullanılmalıdır.

4. Genel olarak *C. sakazakii* suşlarının asit pH'ya önemli ölçüde direnç gösterdiği, 4.5 ve üzerindeki pH değerlerinde üreyebildiği tespit edilmiştir. *C. muytjensii* ATCC 51329 dışında incelen diğer *C. sakazakii* suşları 6 saat boyunca pH 3.5'de canlı kalabilmişlerdir. Analize alınan *C. sakazakii* suşlarının farklı sıcaklıklardaki termal dirençlerinin ise

değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Uygulanan tüm sıcaklıklarda *C. muytjensii* ATCC 51329 suşunun en düşük termal dirence sahip olduğu belirlenmiştir. Buna karşın en yüksek termal dirence sahip suşun proses sırasında pastörizasyon işlemi uygulanmış olan tahıl bazlı ek gıdadan izole edilen G73 kodlu izolat olduğu tespit edilmiştir.

5. Araştırma kapsamında, *Cronobacter* spp. tespitinde klasik kültürel yönteme göre daha kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta sonuç veren PCR bazlı bir yöntem geliştirilmiştir. Kontamine edilmiş bebek mamalarında yalnızca 4 saatlik bir ön zenginleştirme sonrası uygulanan direkt PCR yöntemi ile 1 kob/mL düzeyinde hedef bakteri belirlenebilmiştir. Bebek mamalarının *Cronobacter* spp. ile kontaminasyon düzeyinin oldukça düşük olduğu (0.36-66 kob/100 g) göz önüne alındığında kısa süreli bir zenginleştirme işlemi ile kombine ederek uygulanan PCR yönteminin bebek mamalarında *Cronobacter* spp. tespitinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir.

6. Bebekler ve küçük çocuklar, gıdadan kaynaklanan enfeksiyonlara karşı çok hassastır. Bu nedenle, bebek ve devam mamalarının mikrobiyolojik güvenliği çok önemlidir. Bebek maması gibi ürünlerin, üretim, dağıtım ve kullanımı sırasında yüksek düzeyde mikrobiyolojik kalite kontrolünden geçmeleri gerekmektedir. Dolayısıyla, bebek mamasının hazırlanması ve kullanımı, hem üreticinin hem de ev veya hastane ortamındaki kullanıcının özenini gerektirmektedir. Hastanelerin yenidoğan ünitelerindeki bakıcılar, bebek mamasının steril bir ürün olmadığı ve bu nedenle hazırlama esnasında hijyenik önlemler alınmasının gerekli olduğu konusunda uyarılmalıdır. Hastane çalışanları ve bakıcılar arasında *Cronobacter* enfeksiyonu bilincinin artırılması ve mikroorganizmanın potansiyel tehlikelerine karşı tüm bakıcılara sürekli eğitim verilmesi, yüksek risk altındaki bebeklerin korunması için önemlidir.

7. *Cronobacter* spp.'nin neden olduğu enfeksiyon vakalarının sıklığı son yıllarda artış göstermesine rağmen ülkemizde halen bu bakteri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Araştırma kapsamında elde edilen bulguların bundan sonra yapılacak araştırmalar için katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ancak ülkemizde bebek maması kaynaklı *Cronobacter* enfeksiyonuna karşı duyarlılığın artırılması için konu ile ilgili daha fazla araştırmaya gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- Acar, S. 2009. Hasanabdal köyü termal tesislerinden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 53 s., Ankara.
- Aldova, E., Hauser, O., Postuba, R. 1983. Tween-esterase activity in *Enterobacter sakazakii*. Zbl. Bakt. Hyg A, 256, 103-108.
- Al-Holy, M.A., Lin, M., Abu-Ghoush, M.M., Al-Qadiri, H.M., Rasco, B.A. 2009. Thermal resistance, survival and inactivation of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered and reconstituted infant formula. J. Food Saf., 29, 287-301.
- Al-Holy, M.A., Shin, J.H., Osaili, T.M., Rasco, B.A. 2011. Evaluation of a new enrichment broth for detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula. J. Food Prot., 74(3), 387-93.
- Almeida, C., Azevedo, N.F., Iversen, C., Fanning, S., Keevil, C.W., Vieira, M.J. 2009. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. Appl. Environ. Microbiol., 75, 2925-2930.
- Amalaradjou, M. A. R., Hoagland, T. A., Venkitanarayanan, K. 2009. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde. Int. J. Food Microbiol., 129, 146-149.
- Anonim. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., 358 s., Ankara.
- Anonim. 2009a. Türk Gıda Mevzuatı Bebek Formülleri Tebliği, Tebliğ No: 2009/9.
- Anonim. 2009b. Türk Gıda Mevzuatı Devam Formülleri Tebliği, Tebliğ No: 2009/10.
- Anonim. 2009c. Türk Gıda Mevzuatı Bebek ve Küçük Çocuk Ek Gıdaları Tebliği Tebliğ No: 2009/11.
- Anonymous. 2002. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. FDA. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>. Erişim Tarihi: 12.06.2007
- Anonymous. 2006. Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*, International Standards Organization, ISO/TS 22964, 13 p.
- Arku, B., Mullane, N., Fox, E., Fanning, S., Jordan, K. 2008. *Enterobacter sakazakii* survives spray drying. Int. J. Dairy Technol., 61, 102-108.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 2003. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley&Sons Inc., New York.
- Back, S-B., Jin, H-H., Lee, S-Y. 2009. Inhibitory effect of organic acids against *Enterobacter sakazakii* in laboratory media and liquid foods. Food Control., 20(10), 867-872.
- Beuchat, L.R., Kim, H., Gurtler, J.B., Lin, L-C., Ryu, J-H., Richards, G.M. 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. Int. J. Food Microbiol., 136, 204-213.
- Barron, J.C., Forsythe, S.J., 2007. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. J. Food Prot., 70, 2111-2117.
- Binnet, D.H. 2006. Klinik örneklerden *Burkholderia cepacia* kompleksinin per tabanlı identifikasyonu. Doktora tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 84 s., Ankara.
- Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., Joosten, H.M. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J. Appl. Microbiol., 95, 967-973.
- Cawthorn, D.M., Botha, S., Witthuhn, R.C. 2008. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. Int. J. Food Microbiol., 127, 129-138
- Chap, J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park, J., Osaili, T., Shaker, R., Jaradat, Z., Hartantyo, S.H.P., Abdullah Sani, N., Estuningsih, S., Forsythe, S.J. 2009. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. Int. J. Food Microbiol., 136, 185-188
- Chen, Y., Hammack, T.S., Song, K.Y., Lampel, K.A. 2009. Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollaborative study. J. AOAC Int., 92, 862-872.
- Craven, H.M., McAuley, C.M., Duffy, L.L., Fegan, N. 2010. Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. J. Appl. Microbiol., 109(3), 1044-1052.
- Çakır, İ. 2003. Laktobasillus ve Bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 86 s. Ankara.

- Çakır, İ., Çakmakçı, M.L. 2005. Gıdalarda patojen mikroorganizma aranmasında kullanılan moleküler yöntemler. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.*, 3(12), 1-7.
- Çetinkaya, E. 2011. Gıdalardan izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* suşlarının biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 88s. Ankara.
- Dancer, G.I., Mah, J.H., Rhee, M.S., Hwang, I.G., Kang, D.H. 2009. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.*, 107, 1606-1614.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları II) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No:1021, Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara
- Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., Fanning, S. 2006. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. *Clin. Infect. Dis.*, 42, 996-1002.
- Edelson-Mammel, S.G., Buchanan, R.L. 2004. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J. Food Protect.*, 67, 60-63.
- Edelson-Mammel, S.G., Porteus, M.K., Buchanan, R.L. 2005. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. *J. Food Protect.*, 68(9), 1900-1902.
- Edelson-Mammel, S.G., Porteous, M.K., Buchanan, R.L. 2006. Acid Resistance of Twelve Strains of *Enterobacter sakazakii* and the Impact of Habituating the Cells to an Acidic Environment. *J. Food Sci.*, 71(6), 201-207.
- El-Sharoud, W.M., O'Brien, S., Negrodo, C., Iversen, C., Fanning, S., Healy, B. 2009. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol.*, 9(24), 1-9.
- Estuningsih, S., Kress, C., Hassan, A.A., Akineden, O., Schneider, E., Usleber, E. 2006. *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *J. Food Prot.*, 69, 3013-3017.
- Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., Brenner, D.J. 1980. *Enterobacter sakazakii*, new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 569-584.
- Feer, C.F., Cernela, N., Bolzan, S., Lehner, A., Stephan, R. 2011. Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for detection of *Cronobacter* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 146(2), 200-202.

- Forsythe 2005. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Maternal and Child Nutrition.*, 1, 44-50.
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., Beuchat, L.R. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.*, 104, 1-34.
- Gurtler, J.B., Beuchat, L.R. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J. Food Protect.*, 70, 1579-1586.
- Gutierrez-Rojo, R. and Torres-Chavollo, E. 2007. A rapid polymerase chain reaction assay for *Enterobacter sakazakii* detection in infant milk formulas. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.*, 15, 345–358.
- Gültekin, M., Demirel, N.N. 2006. Hazır toz bebek mamaları ve *Enterobacter sakazakii*. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi.*, 36(1), 67-74.
- Hamilton, J.V., Lehane, M.J., Braig, H.R., 2003. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg. Infect. Dis.*, 9,1355-1356.
- Hassan, A.H., Akineden, Ö., Kress, C., Estuningsih, S., Schneider, E., Usleber, E., 2007. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *Int. J. Food Microbiol.*, 116, 214-220.
- Healy, B., Mullane, N., Collin, V., Mailler, S., Iversen, C., Chatellier, S., Storrs, M., Fanning, S. 2008. Evaluation of an automated repetitive sequence-based PCR system for subtyping *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Prot.*, 71, 1273-1378.
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J. J., Fanning, S. 2010. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: An opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7(4), 339-347
- Hong, Y.H., Park, J.-Y., Park, J.-H., Chung, M.-S., Kwon, K.-S., Chung, K., Won, M., Song, K.-B., 2008. Inactivation of *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella typhimurium* in powdered weaning food by electron-beam irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 77, 1097-1100.
- Iversen, C., Forsythe, S. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Tech.*, 14, 443-454.
- Iversen, C., Lane, M., Forsythe, S.J. 2004a. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38, 378-382.

- Iversen, C., Forsythe, S. 2004b. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.*, 21, 771–777.
- Iversen, C., Druggan, P., Forsythe, S. 2004c. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.*, 96, 133-139.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H. 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. *BMC Evol. Biol.*, 7, 64.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58(6), 1442-1447.
- Jang, H.I and Rhee, M.S. 2009. Inhibitory effect of caprylic acid and mild heat on *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in reconstituted infant formula and determination of injury by flow cytometry. *Int. J. Food Microbiol.*, 133, 113-120.
- Jaradat, Z.W., Ababneh, Q.O., Saadoun, I.M., Samara, N.A., Rashdan, A.M. 2009. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiol.*, 9, 1-9.
- Kandhai, M.C, Reij, M.W., Gorris, L.G.M., Guillaume-Gentil, O., van Schothorst, M. 2004a. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet.*, 363, 39-40.
- Kandhai, M.C., Reij, M.W., van Puyvelde, K., Guillaume-Gentil, O., Beumer, R.R., van Schothorst, M. 2004b. A new protocol for the detection *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. *J. Food Protect.*, 67, 1267-1270.
- Kandhai, M.C., Reij, M.W., Grogno, C., van Schothorst, M., Gorris, L.G.M., Zwietering, M.H. 2006. Effects of Preculturing Conditions on Lag Time and

Specific Growth Rate of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Powdered Infant Formula. Appl. Environ. Microb., 72(4), 2721-2729.

- Kandhai, M.C. 2010. Detection, occurrence, growth and inactivation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). PhD. Thesis. Wageningen University, 240 p., Wageningen.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö. 2011. Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/teplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi., 27(1), 62-74.
- Kim, H., Beuchat, L.R. 2005. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature. J. Food Prot., 68, 2541-2552.
- Kim, H., Ryu, J.H., Beuchat, L.R. 2007. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. Appl. Environ. Microbiol., 73, 1256-1265.
- Kim, T.J., Silva, J.L., Weng, W.L., Chen, W.W., Corbitt, M., Jung, Y.S., Chen, Y.S. 2009. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by water-soluble muscadine seed extracts. Int. J. Food Microbiol., 129, 295–299.
- Kim, S.A, Rhee, M.S. 2011. A new cost-effective, selective and differential medium for the isolation of *Cronobacter* spp. Int. J. Food Microbiol., 136, 169-178.
- Kindle, G., Buse, A., Kampa, D., Meyer-Koenig, U., Daschner, F.D. 1996. Killing activity of microwaves in milk. J. Hosp. Infect., 33, 273-278.
- Krascenicsova, K., Trncikova, T. 2008. Detection and quantification of *Enterobacter sakazakii* by real-time 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the *pale* gene. Food Analytical Methods., 1(2), 85-94.
- Kucerova, E., Clifton, S.W., Xia, X-Q., Long, F., Porwollik, S., Fulton, L., Fronick, C., Minx, P., Kyung, K., Warren, W., Fulton, R., Feng, D., Wollam, A., Shah, N., Bhonagiri, V., Nash, W.E., Hallsworth-Pepin, K., Wilson, R.K., McClelland, M., Forsythe, S.J. 2010. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. PLoS ONE., 5(3), 9556
- Kuhnert, P., Korczak, B.M., Stephan, R., Joosten, H., Iversen, C. 2009. Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis (MLSA). Int. J. Food Microbiol., 136, 152-158.
- Kuzina, L.V., Peloquin, J.J., Vacek, D.C., Miller, T.A. 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). Curr. Microbiol., 42, 290-294.

- Lai, K.K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: Case reports and a review of the literature. *Med Baltimore.*, 80, 113-122.
- Lee, J.W., Oh, S.H., Byun, E.B., Kim, J.H., Woon, J.H., Byun, M.W., 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* of dehydrated infant formula by gamma-irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 76, 1858-1861.
- Lee, S-Y., Jin, H-H. 2008. Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. *Lett Appl. Microbiol.*, 47, 315-321.
- Lehner, A., Stephan, R. 2004. Review Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Protect.*, 67(12), 2850-2857.
- Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R. 2004. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.*, 4, 43.
- Lehner, A., Nitzsche, S., Breeuwer, P., Deip, B., Thelen, K., Stephan, R. 2006. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol.*, 6, 15.
- Lenati, R.F., O'Connor, D.L., Hebert, K.C., Farber, J.M., Pagotto, F.J. 2008. Growth and survival of *Enterobacter sakazakii* in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula. *Int. J. Food Microbiol.*, 122, 171-179.
- Leuschner, R.G.K., Baird, F., Donald, B., Cox, L.J. 2004. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Food Microbiol.*, 21, 527-533.
- Lin, L.C., Beuchat, L.R. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. *Food Microbiol.*, 24, 767-777.
- Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., Luo, M., Huang, X. 2006. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Microbiol. Methods.*, 65, 21-31.
- Miled-Bennour, R., Ells, T.C., Pagotto, F.J., Farber, J.F., Kerouanton, A., Meheut, T., Colin, P., Joosten, H., Leclercq, A., Bessr, N.G. 2010. Genotypic and phenotypic characterisation of a collection of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, 139, 116-125.
- Mohan Nair, M.J. and Venkitanarayanan, K.S. 2006. Cloning and Sequencing of the *ompA* Gene of *Enterobacter sakazakii* and Development of an *ompA*-Targeted

- PCR for Rapid Detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. Appl. Environ. Microbiol., 72(4), 2539-2546.
- Mullane, N.R., Drudy, D., Whyte, P., O'Mahony, M., Scannell, A.G.M., Wall, P.G., Fanning, S. 2006. *Enterobacter sakazakii*: Biological properties and significance in dried infant milk Formula (IMF) powder. Int. J. Dairy Technol., 59(2), 102-111.
- Mullane, N.R., Whyte, p., Wall, P.G., Quinn, T., Fanning, S. 2007. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. Int. J. Food Microbiol., 116, 73-81.
- Muytjens, H.L., Zanen, H.C., Sonderkamp, H.J., Kolee, L.A., Wachsmuth, I.K., Farmer, J.J. 1983. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. J. Clin. Microbiol., 18, 115-120.
- Muytjens, H.L., Van Der Ros-Van De Repe, J., Van Druten, H.A.M. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha glucosidase reaction and reproducibility of the test system. J. Clin. Microbiol., 20, 684-687.
- Muytjens, H.L., Van Der Ros-Van De Repe, J. 1986. Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species with special reference to *Enterobacter sakazakii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 29, 367-370.
- Muytjens, H.L., Roelofs-Willemse, H., Jaspar, G.H. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol., 26, 743-746.
- Nair, M.K.M., Joy, J., Venkitanarayanan, K.S. 2004. Inactivation *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by monocaprylin. J. Food Protect., 67(12), 2815-2819.
- Nazarowec-White, M., Farber, J.M. 1997a. *Enterobacter sakazakii*: A review. Int. J. Food Microbiol., 34, 103-113.
- Nazarowec-White, M., Farber, J.M. 1997b. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Food Protect., 60, 226-230.
- Nazarowec-White, M., Farber, J.M. 1997c. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. Lett. Appl. Microbiol., 24, 9-13.
- Nazarowec-White, M., Farber, J.M. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. J. Med. Microbiol., 48, 559-567.

- Noriega, FR, Kotloff, K.L., Martin, M.A., Schwalbe, R.S. 1990. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Pediatr. Infect. Dis.*, 9, 447-449.
- O'Brien, S., Healy, B., Negredo, C., Anderson, W., Fanning, S., Iversen, C. 2009a. Prevalence of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in follow-on infant formulae and infant drinks. *Lett Appl. Microbiol.*, 48, 536-541.
- O'Brien, S., Healy, B., Negredo, C., Fanning, S., Iversen, C. 2009b. Evaluation of a new one-step enrichment in conjunction with a chromogenic medium for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. *J. Food Prot.*, 72, 1472-1475
- Oh, S-W., Kang, D-H. 2004. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5692-5694.
- Oh, S-W., Kang, D-H. 2005. Rapid enumeration of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted milk formula by fluorogenic most-probable-number assay using 96-well microtiter plate. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.*, 13(4), 318.
- Osaili, T., Al-Nabulsi, A., Shaker, R., Ayyash, M., Olaimat, A., Abu Al-Hasan, A., Kadora, K., Holley, R. 2008a. Effect of environmental stresses on the sensitivity of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant milk formula to gamma radiation. *Lett Appl. Microbiol.*, 47, 79-84.
- Osaili, T.M., Shaker, R.R., Olaimat, A.N., Al-Nabulsi, A.A., Al-Holy, M.A., Forsythe, S.J. 2008b. Detergent and Sanitizer Stresses Decrease the Thermal Resistance of *Enterobacter sakazakii* in Infant Milk Formula. *J. Food Sci.*, 73, 3.
- Osaili, T.M. and Forsythe, S. 2009. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 214-220.
- Osaili, T.M., Shaker, R.R., Al-Haddaq, M.S., Al-Nabulsi, A.A., Holley, R.A. 2009. Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula. *J. Appl. Microbiol.*, 107, 928-935.
- Pagotto, F.J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S., Farber, J.M. 2003. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and on vivo. *J. Food Protect.*, 66, 370-377.
- Popp, A., Iversen, C., Fricker-Feer, C., Gschwend, K., Stephan, R., 2009. Identification of *Enterobacteriaceae* isolates from raw ingredients, environmental samples and products of an infant formula processing plant. *Archiv für Lebensmittelhygiene.*, 60, 92-97.

- Reich, F., König, R., Von Wiese, W., Klein, G. 2010. Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. *Int. J. Food Microbiol.*, 140, 214-217.
- Restaino, L., Frampton, E.W., Lionberg, W.C., Becker, R.J. 2006. A Chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources. *J. Food Protect.*, 69, 315-322.
- Richards, G.M., Gurtler, J.B., Beuchat, L.R., 2005. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 844-850.
- Shaker, R., Osaili, T., Al-Omary, W., Jaradat, Z., Al-Zuby, M. 2007. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control.*, 18, 1241-1245.
- Shaker, R.R., Osaili, T.M., Abu Al-Hasan, A.S., Ayyash, M.M., Forsythe, S.J. 2008. Effect of Desiccation, Starvation, Heat, and Cold Stresses on the Thermal Resistance of *Enterobacter sakazakii* in Rehydrated Infant Milk Formula. *J. Food Sci.*, 73,7.
- Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L., Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Cont Hosp. Ep.*, 10, 398-401.
- Skladal, P., Mascini, M., Salvadori, C., Zannoni, G. 1993. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. *Enzyme Microb. Tech.*, 15, 508-512.
- Seo, K.H. and Brackett, R.E. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J. Food Prot.*, 68, 59-63.
- Stoop, B., Lehner, A., Iversen, C., Fanning, S., Stephan, R. 2009. Development and evaluation of rpoB-based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int. J. Food Microbiol.*, 136(2), 165-168.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Temiz, A. 1994. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınları, 274s. Ankara.

- Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Olgun, A., Sarıkaya, A.T., Arda, N. 1999. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel Kitabevleri, 236 s., İstanbul.
- Terragno, R., Salve, A., Pichel, M., Epszteyn, S., Brengi, S., Binsztein, N. 2009. Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported infant Formula in Argentina. Int. J. Food Microbiol., 136, 93-97.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, 434s, Ankara.
- Turcovsky, I., Kunikova, K., Drahovska, H., Kaclikova, E. 2011. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. Antonie van Leeuwenhoek., 99(2), 257-69.
- Urmenyi, A.M.C., Franklin, A.W., 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. Lancet., 1, 313-315.
- Van Acker, J., De Smet, F., Muyltermans, G., Bougateg, A., Naessens, A., Lauwers, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. J. Clin. Microbiol., 39, 293-297.
- Weir, E. 2002. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. Can. Med. Assoc. J., 166, 1570.
- Ye, Y., Wu, Q., Zhou, Y., Dong, X., Zhang, J. 2008. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *E. sakazakii* in dry food samples. J. Microbiol. Methods., 75, 392-397.
- Zhou, Y., Wu, Q., Xu, X., Yang, X., Ye, Y. and Zhang, J. 2008. Development of an immobilization and detection method of *Enterobacter sakazakii* from powdered infant formula Food Microbiol., 25, 648- 652.

EKLER

EK 1. TERMAL İNAKTİVASYON SONUÇLARI

EK 2. FARKLI SICAKLIK KOŞULLARINDA GELİŞME SONUÇLARI

EK 3. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

EK 4. ARAŞTIRMADA KULLANILAN KİMYASALLAR

EK 5. DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI

EK 1 TERMAL İNAKTİVASYON SONUÇLARI

Çizelge 1 G1 kodlu izolatin 54 °C, 56 °C ve 58 °C’da termal inaktivasyonu (log kob/mL)

G1					
Süre (dakika)	54 °C	Süre (dakika)	56 °C	Süre (saniye)	58 °C
0	7.40±0.02	0	7.23±0.03	0	7.39±0.07
3	6.86±0.04	1	6.68±0.02	15	6.50±0.05
6	6.36±0.10	2	6.01±0.04	30	5.74±0.04
9	5.73±0.04	3	5.32±0.03	45	5.18±0.02
12	5.14±0.03	4	4.28±0.03	60	4.61±0.06
15	4.54±0.03	5	3.99±0.02	75	4.11±0.06
18	4.44±0.05	6	3.16±0.09	90	3.47±0.02
21	4.11±0.03	7	2.91±0.08	105	3.04±0.04
24	3.45±0.07	8	2.18±0.08	120	2.69±0.03
27	2.86±0.05	9	1.29±0.11		
30	2.71±0.03				
33	2.43±0.03				

Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

Çizelge 2 G17 kodlu izolatin 54 °C, 56 °C ve 58 °C’da termal inaktivasyonu (log kob/mL)

G17					
Süre (dakika)	54 °C	Süre (dakika)	56 °C	Süre (saniye)	58 °C
0	7.58±0.02	0	7.53±0.03	0	7.46±0.03
3	7.19±0.06	1	7.16±0.03	15	6.94±0.03
6	6.71±0.05	2	6.51±0.06	30	6.26±0.04
9	6.10±0.02	3	6.00±0.04	45	5.62±0.06
12	5.39±0.04	4	5.11±0.04	60	5.01±0.05
15	5.01±0.05	5	4.14±0.02	75	4.55±0.06
18	4.77±0.04	6	3.75±0.03	90	3.63±0.06
21	4.11±0.07	7	3.37±0.04	105	3.07±0.06
24	3.68±0.04	8	3.02±0.06	120	2.23±0.03
27	3.41±0.05	9	2.55±0.04		
30	3.10±0.03	10	2.20±0.05		
33	2.71±0.04	11	1.79±0.05		

Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

Çizelge 3 G40 kodlu izolatin 54 °C, 56 °C ve 58 °C’da termal inaktivasyonu (log kob/mL)

G40					
Süre (dakika)	54 °C	Süre (dakika)	56 °C	Süre (saniye)	58 °C
0	7.16±0.02	0	7.30±0.03	0	7.03±0.03
3	6.95±0.02	1	6.97±0.03	15	6.38±0.02
6	6.55±0.05	2	6.61±0.06	30	5.24±0.06
9	5.95±0.03	3	6.17±0.02	45	4.37±0.04
12	5.08±0.03	4	5.44±0.08	60	3.37±0.10
15	4.50±0.08	5	4.87±0.03	75	2.71±0.08
18	4.09±0.02	6	4.11±0.03	90	2.23±0.05
21	3.72±0.07	7	3.42±0.02	105	1.78±0.04
24	3.15±0.09	8	2.95±0.03	120	0.67±0.07
27	2.62±0.02	9	2.56±0.03		
30	2.36±0.04	10	2.00±0.07		
33	1.77±0.04	11	1.80±0.10		

Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

Çizelge 4 G73 kodlu izolatin 54 °C, 56 °C, ve 58 °C’da termal inaktivasyonu

G73					
Süre (dakika)	54 °C	Süre (dakika)	56 °C	Süre (saniye)	58 °C
0	7.25±0.03	0	7.49±0.04	0	7.25±0.07
3	7.22±0.07	2	7.12±0.06	0.5	6.68±0.09
6	7.01±0.12	4	6.97±0.02	1	6.27±0.05
9	6.86±0.10	6	6.42±0.03	1.5	5.68±0.03
12	6.62±0.02	8	5.86±0.02	2	4.94±0.04
15	6.47±0.02	10	5.13±0.04	2.5	4.58±0.04
18	6.31±0.03	12	4.67±0.05	3	4.12±0.02
21	5.91±0.04	14	4.04±0.03	3.5	3.82±0.03
24	5.65±0.05	16	3.72±0.09	4	3.61±0.03
27	5.14±0.05	18	3.49±0.06	4.5	3.29±0.07
30	4.97±0.03	20	3.22±0.04	5	2.79±0.04
33	4.66±0.21			5.5	2.50±0.03
				6	2.80±0.04

Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

Çizelge 5 *C. muytjensii* ATCC 51329 suşunun 54 °C, 56 °C ve 58 °C’da termal inaktivasyonu (log kob/mL)

<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329					
Süre (dakika)	54 °C	Süre (dakika)	56 °C	Süre (saniye)	58 °C
0	7.29±0.03	0	7.20±0.04	0	7.34±0.07
2	6.70±0.04	1	6.09±0.04	15	5.84±0.09
4	5.89±0.05	2	5.33±0.03	30	4.62±0.06
6	5.62±0.09	3	4.33±0.06	45	4.19±0.04
8	5.29±0.03	4	3.45±0.09	60	3.30±0.14
10	4.69±0.08	5	2.63±0.08	75	2.44±0.04
12	3.58±0.05	6	1.65±0.05	90	1.90±0.05
14	2.49±0.04				
16	1.69±0.06				

Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

EK 2 FARKLI SICAKLIK KOŞULLARINDA GELİŞME SONUÇLARI

Çizelge 1 *C. sakazakii* suşlarının 4 °C'da gelişimi (log kob/mL)

Süre (gün)	G1	G17	G40	G73	ATCC 51329 ¹
0	3.42±0.02	3.37±0.01	3.31±0.04	3.24±0.02	3.22±0.05
2	3.36±0.05	3.32±0.02	2.98±0.05	3.18±0.03	2.82±0.07
4	3.21±0.08	3.20±0.03	2.87±0.02	3.13±0.02	2.58±0.05
6	2.92±0.02	2.95±0.05	2.58±0.06	2.89±0.05	2.17±0.04
8	2.35±0.05	2.63±0.06	2.30±0.04	2.74±0.06	1.93±0.03
10	2.14±0.06	2.34±0.05	1.81±0.03	2.50±0.02	1.39±0.09

¹: *C. mytjensii* ATCC 51329, Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

Çizelge 2 *C. sakazakii* suşlarının 10 °C'da gelişimi (log kob/mL)

Süre (gün)	G1	G17	G40	G73	ATCC 51329 ¹
0	3.47±0.02	3.36±0.01	3.11±0.03	3.46±0.02	2.78±0.02
1	3.70±0.05	3.62±0.03	3.43±0.03	3.64±0.07	2.93±0.07
2	4.15±0.02	4.27±0.04	4.17±0.05	4.16±0.03	3.57±0.04
3	4.85±0.02	5.18±0.03	5.10±0.03	5.12±0.06	4.37±0.05
4	5.61±0.06	6.00±0.04	6.08±0.03	6.01±0.04	5.19±0.05
5	6.14±0.06	6.73±0.08	7.08±0.03	6.85±0.04	6.11±0.04
6	6.95±0.04	7.71±0.06	7.85±0.10	7.43±0.10	7.01±0.03
7	7.38±0.02	8.06±0.04	8.02±0.06	7.89±0.02	7.53±0.03
8	7.85±0.05	8.24±0.08	8.14±0.03	8.15±0.02	7.94±0.03
9	8.06±0.02	8.43±0.04	8.22±0.05	8.37±0.04	8.03±0.06
10	8.14±0.02	8.48±0.03	8.40±0.04	8.52±0.04	8.15±0.09

¹: *C. mytjensii* ATCC 51329, Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

Çizelge 3 *C. sakazakii* suşlarının 20 °C’da gelişimi (log kob/mL)

Süre (saat)	G1	G17	G40	G73	ATCC 51329 ¹
0	3.29±0.01	3.22±0.02	3.10±0.04	3.21±0.01	2.99±0.02
2	3.46±0.04	3.42±0.01	3.37±0.06	3.43±0.07	3.09±0.05
4	3.78±0.08	3.86±0.04	3.82±0.05	3.82±0.03	3.47±0.09
6	4.53±0.05	4.42±0.03	4.41±0.02	4.41±0.07	4.20±0.06
8	5.05±0.03	4.99±0.05	5.00±0.02	5.04±0.04	4.69±0.07
10	5.78±0.10	5.60±0.08	5.46±0.07	5.65±0.03	5.24±0.09
12	6.23±0.09	6.11±0.09	6.06±0.02	6.08±0.04	5.73±0.07
14	6.66±0.04	6.68±0.05	6.44±0.03	6.54±0.08	6.27±0.06
16	7.19±0.02	7.07±0.04	7.09±0.03	7.09±0.04	6.84±0.05
18	7.58±0.08	7.39±0.07	7.32±0.05	7.56±0.05	7.28±0.10
20	7.88±0.03	7.60±0.05	7.46±0.03	7.72±0.03	7.52±0.06
22	7.97±0.13	7.82±0.02	7.86±0.05	7.82±0.04	7.90±0.03
24	8.24±0.04	8.13±0.05	8.07±0.03	8.09±0.02	8.13±0.02

¹: *C. mytjensii* ATCC 51329, Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

Çizelge 4 *C. sakazakii* suşlarının 30 °C’da gelişimi (log kob/mL)

Süre (saat)	G1	G17	G40	G73	ATCC 51329 ¹
0	3.47±0.02	3.40±0.03	3.07±0.03	3.25±0.04	3.05±0.03
2	4.11±0.04	4.03±0.03	4.00±0.07	4.01±0.03	4.09±0.03
4	5.24±0.11	5.45±0.03	5.24±0.06	5.38±0.05	5.32±0.06
6	6.71±0.03	6.47±0.04	6.59±0.03	6.60±0.06	6.46±0.04
8	7.71±0.02	7.69±0.04	7.60±0.06	7.66±0.08	7.49±0.06
10	8.23±0.02	8.30±0.03	8.21±0.03	8.13±0.02	8.10±0.02
12	8.55±0.06	8.48±0.02	8.59±0.05	8.48±0.03	8.41±0.04
14	8.65±0.05	8.71±0.03	8.77±0.04	8.68±0.02	8.79±0.08
16	8.88±0.03	8.87±0.03	8.92±0.03	8.95±0.03	8.85±0.05
18	9.01±0.04	9.05±0.06	9.08±0.03	9.12±0.08	8.95±0.03
20	9.10±0.04	9.11±0.08	9.23±0.11	9.22±0.03	9.08±0.03
22	9.15±0.05	9.23±0.03	9.28±0.08	9.28±0.05	9.17±0.02
24	9.25±0.10	9.34±0.02	9.33±0.10	9.36±0.06	9.28±0.04

¹: *C. mytjensii* ATCC 51329, Değerler aritmetik ortalama ±standart hata şeklinde verilmiştir.

EK 3 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

Tryptic Soy Broth (TSB, Merck)

Bileşimi, Peptone from casein 17.0 g/L; Peptone from soymeal 3.0 g/L; D(+) Glucose 2.5 g/L; NaCl 5.0 g/L; K₂HPO₄ 2.5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri, 30 g/L olacak şekilde damıtık su içinde çözülür ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renkte olup, 25 °C'da pH'sı 7.3±0.2'dir.

Tryptic Soy Agar (TSA, Merck)

Bileşimi, Peptone from casein 15.0 g/L; Peptone from soymeal 5.0 g/L; NaCl 5.0 g/L; Agar-agar 15.0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri, 40 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir ve steril Petri kutularına 12.5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renktedir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7.3±0.2'dir.

Plate Count Agar (PCA, Merck)

Bileşimi, Peptone from casein 5.0 g/L; Yeast extract 2.5 g/L; D(+) Glucose 1.0 g/L; Agar-agar 14.0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri, 22.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir ve steril Petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak, çok açık sarımsı renktedir ve 25 °C'da pH'sı 7.0±0.2'dir.

Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS, Merck)

Bileşimi, Peptone 10.0 g/L; NaCl 5.0 g/L; Na₂HPO₄.12H₂O 9 g/L; K₂HPO₄ 1.5 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri 25.5 g/L olacak şekilde su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir, 500 mL erlenlere 225'er mL olacak şekilde dağıtılır ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renklidir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH 7.0±0.2'dir.

Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL, Merck)

Bileşimi, Peptone from meat 7.0 g/L; Yeast Extract 3.0 g/L; Lactose 10.0 g/L; NaCl 5.0 g/L; Ox Bile (Bile Salt Mixture) 1.5 g/L; Neutral Red 0.03 g/L; Crystal Violet 0.002 g/L; Agar-agar 13.0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri, 39.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde karıştırılarak kaynatılır ve kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, soğuyunca steril Petri kutularına 12.5'er mL dökülür. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7.4±0.2'dir. Hazırlanmış besiyeri parlak ve karanlık kırmızı renklidir.

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Merck)

Bileşimi, Peptone 7.0 g/L; Yeast extract 3.0 g/L; D(+) Glucose 10.0 g/L; NaCl 5.0 g/L; Ox bile (Bile salt mixture) 1.5 g/L; Neutral red 0.03 g/L; Crystal violet 0.002 g/L; Agar-agar 13.0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri, 39.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde karıştırılarak kaynatılır ve kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, 45-50 °C'a soğuyunca steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri parlak ve koyu kırmızı-kahve renklidir, pH'sı 25 °C'da 7.3±0.2'dir.

Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST, Merck)

Bileşimi, Tryptose 20.0 g/L; Lactose 5.0 g/L; NaCl 5.0 g/L; Sodium Lauryl Sulfate 0.1 g/L; K₂HPO₄ 2.75 g/L; KH₂PO₄ 2.75 g/L; L-Tryptophane 1.0 g/L; MUG 0.1 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri, 36.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 6.8±0.2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir.

Druggan-Forsythe-Iversen Agar (DFI, Oxoid)

Bileşimi, Tryptone 15.0 g/L, Soya peptone 5.0 g/L, Sodium chloride 5.0 g/L, Ferric ammonium citrate 1.0 g/L, Sodium desoxycholate 1.0 g/L, Sodium thiosulphate 1.0 g/L, Chromogen 0.1 g/L, Agar 15.0 g/L şeklindedir. Dehidre besiyeri, 43.1 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir ve steril Petri kutularına dökülür. Sterilizasyon sonrası besiyeri pH'sı 25 °C'da 7.3 ± 0.2 'dir

EK 4 ARAŞTIRMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

CTAB/NaCl çözeltisi: 4,1 g NaCl 80 ml saf suda çözülür. Üzerine 10 g CTAB ilave edilir ve karıştırılarak 65 °C'a ısıtılır. Hacim, saf su ile 100 mL'ye ayarlanır.

Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 mL izoamilalkol karıştırılarak hazırlanır. -20 °C'da muhafaza edilir.

Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi: 24 ml kloroform ve 1 mL izoamilalkol karıştırılarak hazırlanır -20 °C'da muhafaza edilir.

5M NaCl çözeltisi: 29.22 g NaCl damıtık suda çözülerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.

Etidyum bromür çözeltisi: 1 g etidyum bromür 100 mL damıtık su içerisinde magnetik karıştırıcı kullanılarak çözülür ve karanlık koşullarda 4 °C'da muhafaza edilir.

1XTE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu: 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA saf su içerisinde çözülür ve pH'sı 8'e ayarlanır Son hacim 200 mL'ye tamamlanarak otoklavda sterilize edilir.

1XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu: 100 ml 10XTBE (0.9M Tris, 0.9M Borik Asit ve 0.02M EDTA)'nin hacmi steril damıtık su 1 litreye tamamlanarak hazırlanır.

3M sodyum asetat (pH 4.8): 12,3 g sodyum 40 mL suda çözülür ve pH'sı glasiyel asetik asit ile 4.8'e ayarlanarak ve hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.

% 10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS'in 100 ml saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlanır.

EK 5 DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI

G1 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|JF330137.1](#) Cronobacter sakazakii strain fmb11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1483, Score = 1537 bits (832), Expect = 0.0, Identities = 832/832 (100%), Gaps = 0/832 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1   TGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGA 60
          |||
Sbjct 106  TGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGA 165

Query 61  CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT 120
          |||
Sbjct 166  CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT 225

Query 121 AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC 180
          |||
Sbjct 226  AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC 285

Query 181  ACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC 240
          |||
Sbjct 286  ACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC 345

Query 241  AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAA 300
          |||
Sbjct 346  AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAA 405

Query 301  GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGCTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGC 360
          |||
Sbjct 406  GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGCTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGC 465

Query 361  AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT 420
          |||
Sbjct 466  AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT 525

Query 421  AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCC 480
          |||
Sbjct 526  AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCC 585

Query 481  CCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGT 540
          |||
Sbjct 586  CCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGT 645

Query 541  AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC 600
          |||
Sbjct 646  AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC 705

Query 601  GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGA 660
          |||
Sbjct 706  GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGA 765

Query 661  TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGG 720
          |||
Sbjct 766  TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGG 825

Query 721  CTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TC 780
          |||
Sbjct 826  CTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TC 885

Query 781  AAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA 832
          |||
Sbjct 886  AAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA 937
```


G6 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|JN592601.1](#) Cronobacter sakazakii strain IARI-T-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1338, Score = 1543 bits (835), Expect = 0.0, Identities = 835/835 (100%), Gaps = 0/835 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1   TGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGA 60
          |||
Sbjct 36   TGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGA 95

Query 61   CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT 120
          |||
Sbjct 96   CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT 155

Query 121  AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC 180
          |||
Sbjct 156  AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC 215

Query 181  ACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAC 240
          |||
Sbjct 216  ACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAC 275

Query 241  AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAA 300
          |||
Sbjct 276  AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAA 335

Query 301  GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGC 360
          |||
Sbjct 336  GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTTACCCGC 395

Query 361  AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT 420
          |||
Sbjct 396  AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT 455

Query 421  AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCC 480
          |||
Sbjct 456  AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCC 515

Query 481  CCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGT 540
          |||
Sbjct 516  CCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGT 575

Query 541  AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC 600
          |||
Sbjct 576  AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC 635

Query 601  GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA 660
          |||
Sbjct 636  GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA 695

Query 661  TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGG 720
          |||
Sbjct 696  TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGG 755

Query 721  CTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TC 780
          |||
Sbjct 756  CTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TC 815

Query 781  AAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGC 835
          |||
Sbjct 816  AAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGC 870
```

G12 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|HQ880364.1](#) Cronobacter sakazakii strain G4080 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1441, Score = 1537 bits (832), Expect = 0.0, Identities = 844/849, (99%), Gaps = 3/849 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1   GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 60
          |||
Sbjct 102  GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 161

Query 61  TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 120
          |||
Sbjct 162  TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 221

Query 121 GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 180
          |||
Sbjct 222  GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 281

Query 181  CCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 240
          |||
Sbjct 282  CCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 341

Query 241  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 300
          |||
Sbjct 342  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 401

Query 301  TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTT 360
          |||
Sbjct 402  TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTT 461

Query 361  ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCA 420
          |||
Sbjct 462  ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCA 521

Query 421  AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTG 480
          |||
Sbjct 522  AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTG 581

Query 481  AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGTAGGCTTGTAGTCTCGTAGAG 540
          |||
Sbjct 582  AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGTAGGCTTGTAGTCTCGTAGAG 641

Query 541  GGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGACGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGG 600
          |||
Sbjct 642  GGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATG-CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGG 700

Query 601  CGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAATAGCGTGGGGAGCAAACA 660
          |||
Sbjct 701  CGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA-AGCGTGGGGAGCAAACA 759

Query 661  GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTGACTTGGAGGTTGTGCCCTT 720
          |||
Sbjct 760  GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC-GACTTGGAGGTTGTGCCCTT 818

Query 721  GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGG 780
          |||
Sbjct 819  GAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGG 878

Query 781  TTAAAACCTCAAATCAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAATTCG 840
          |||
Sbjct 879  TTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAATTCG 938

Query 841  ATGCAACGC 849
          |||
Sbjct 939  ATGCAACGC 947
```

G17 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|JN592601.1](#) Cronobacter sakazakii strain IARI-T-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1338, Score = 1568 bits (849), Expect = 0.0, Identities = 849/849 (100%), Gaps = 0/849 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1 GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 60
      |||
Sbjct 30 GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 89

Query 61 TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 120
      |||
Sbjct 90 TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 149

Query 121 GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 180
      |||
Sbjct 150 GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 209

Query 181 CCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 240
      |||
Sbjct 210 CCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 269

Query 241 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 300
      |||
Sbjct 270 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 329

Query 301 TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTT 360
      |||
Sbjct 330 TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTT 389

Query 361 ACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCA 420
      |||
Sbjct 390 ACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCA 449

Query 421 AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTG 480
      |||
Sbjct 450 AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTG 509

Query 481 AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAG 540
      |||
Sbjct 510 AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAG 569

Query 541 GGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC 600
      |||
Sbjct 570 GGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC 629

Query 601 GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 660
      |||
Sbjct 630 GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 689

Query 661 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 720
      |||
Sbjct 690 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 749

Query 721 GCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTA 780
      |||
Sbjct 750 GCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTA 809

Query 781 AAAC TCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATG 840
      |||
Sbjct 810 AAAC TCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATG 869

Query 841 CAACGCGAA 849
      |||
Sbjct 870 CAACGCGAA 878
```

G28 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|GU252269.1](#) Cronobacter sakazakii strain KYU127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1110, Score = 1533 bits (830), Expect = 0.0, Identities = 830/830 (100%), Gaps = 0/830 (0%), Strand=Plus/Plus

```

Query 1   GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 60
          |||
Sbjct 75   GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 134

Query 61   TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 120
          |||
Sbjct 135  TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 194

Query 121  GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 180
          |||
Sbjct 195  GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 254

Query 181  CCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 240
          |||
Sbjct 255  CCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 314

Query 241  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 300
          |||
Sbjct 315  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 374

Query 301  TGTAAGTACTTTTACGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTT 360
          |||
Sbjct 375  TGTAAGTACTTTTACGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAATTGACGTT 434

Query 361  ACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCA 420
          |||
Sbjct 435  ACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCA 494

Query 421  AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTG 480
          |||
Sbjct 495  AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTG 554

Query 481  AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAG 540
          |||
Sbjct 555  AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAG 614

Query 541  GGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC 600
          |||
Sbjct 615  GGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC 674

Query 601  GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 660
          |||
Sbjct 675  GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 734

Query 661  ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 720
          |||
Sbjct 735  ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 794

Query 721  GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTA 780
          |||
Sbjct 795  GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTA 854

Query 781  AAATCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT 830
          |||
Sbjct 855  AAATCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT 904
    
```

G33 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[emb|FN401364.1](#) Cronobacter sakazakii partial 16S rRNA gene, isolate PHLTA-37

Length=1419, Score = 1554 bits (841), Expect = 0.0, Identities = 841/841 (100%), Gaps = 0/841 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGG 60
|
Sbjct 82 CTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGG 141

Query 61 ACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAG 120
|
Sbjct 142 ACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAG 201

Query 121 TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC 180
|
Sbjct 202 TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC 261

Query 181 CACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA 240
|
Sbjct 262 CACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA 321

Query 241 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA 300
|
Sbjct 322 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA 381

Query 301 AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCCG 360
|
Sbjct 382 AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCCG 441

Query 361 CAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGT 420
|
Sbjct 442 CAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGT 501

Query 421 TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATC 480
|
Sbjct 502 TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATC 561

Query 481 CCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 540
|
Sbjct 562 CCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCAATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 621

Query 541 TAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG 600
|
Sbjct 622 TAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG 681

Query 601 CGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 660
|
Sbjct 682 CGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 741

Query 661 ATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG 720
|
Sbjct 742 ATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG 801

Query 721 GCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACT 780
|
Sbjct 802 GCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACT 861

Query 781 CAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACG 840
|
Sbjct 862 CAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACG 921

Query 841 C 841
|
Sbjct 922 C 922
```

G36 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|HQ880405.1](#) Cronobacter sakazakii strain G4083 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1462, Score = 1520 bits (823), Expect = 0.0, Identities = 823/823 (100%), Gaps = 0/823 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1 ACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACG 60
      |||
Sbjct 126 ACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACG 185

Query 61 GACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA 120
      |||
Sbjct 186 GACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA 245

Query 121 GTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG 180
      |||
Sbjct 246 GTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG 305

Query 181 CCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC 240
      |||
Sbjct 306 CCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC 365

Query 241 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA 300
      |||
Sbjct 366 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA 425

Query 301 AAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCC 360
      |||
Sbjct 426 AAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCC 485

Query 361 GCAGAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCG 420
      |||
Sbjct 486 GCAGAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCG 545

Query 421 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAAGATGTGAAAT 480
      |||
Sbjct 546 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAAGATGTGAAAT 605

Query 481 CCCCAGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 540
      |||
Sbjct 606 CCCCAGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 665

Query 541 GTAGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG 600
      |||
Sbjct 666 GTAGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG 725

Query 601 GCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 660
      |||
Sbjct 726 GCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 785

Query 661 GATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT 720
      |||
Sbjct 786 GATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT 845

Query 721 GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAC 780
      |||
Sbjct 846 GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAC 905

Query 781 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG 823
      |||
Sbjct 906 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG 948
```

G40 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|HQ880310.1](#) Cronobacter sakazakii strain G4037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1466, Score = 1539 bits (833), Expect = 0.0, Identities = 833/833 (100%), Gaps = 0/833 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1   GGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 60
          |||
Sbjct 125  GGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 184

Query 61  TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 120
          |||
Sbjct 185  TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 244

Query 121 GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 180
          |||
Sbjct 245  GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 304

Query 181  CCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 240
          |||
Sbjct 305  CCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 364

Query 241  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 300
          |||
Sbjct 365  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 424

Query 301  TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTAAATAACCGCAGCGATTGACGTT 360
          |||
Sbjct 425  TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTAAATAACCGCAGCGATTGACGTT 484

Query 361  ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA 420
          |||
Sbjct 485  ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA 544

Query 421  AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTG 480
          |||
Sbjct 545  AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTG 604

Query 481  AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAG 540
          |||
Sbjct 605  AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAG 664

Query 541  GGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC 600
          |||
Sbjct 665  GGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC 724

Query 601  GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 660
          |||
Sbjct 725  GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 784

Query 661  ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 720
          |||
Sbjct 785  ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 844

Query 721  GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTA 780
          |||
Sbjct 845  GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTA 904

Query 781  AAATCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA 833
          |||
Sbjct 905  AAATCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA 957
```

G46 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|HQ880405.1](#) Cronobacter sakazakii strain G4083 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1462, Score = 1504 bits (814), Expect = 0.0, Identities = 824/828 (99%), Gaps = 3/828 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1   AACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTAC 60
          |||
Sbjct 125  AACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTAC 184

Query 61  GGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCT 120
          |||
Sbjct 185  GGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCT 244

Query 121 AGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA 180
          |||
Sbjct 245  AGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA 304

Query 181  GCCACACTGGAAGTGGAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG 240
          |||
Sbjct 305  GCCACACTGGAAGTGGAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG 364

Query 241  CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT 300
          |||
Sbjct 365  CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT 424

Query 301  AAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACC 360
          |||
Sbjct 425  AAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACC 484

Query 361  CGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGC 420
          |||
Sbjct 485  CGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGC 544

Query 421  GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAA 480
          |||
Sbjct 545  GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAA 604

Query 481  TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGG 540
          |||
Sbjct 605  TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGG 664

Query 541  GGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA 600
          |||
Sbjct 665  GGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA 724

Query 601  GGCGGCCCCCTGGTACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAATAGCGTGGGAGCAAACAGGA 660
          |||
Sbjct 725  GGCGGCCCCCTGG-ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA-AGCGTGGGAGCAAACAGGA 782

Query 661  TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 720
          |||
Sbjct 783  TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTC-GACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 841

Query 721  GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCTAGGTTA 780
          |||
Sbjct 842  GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA 901

Query 781  AAACCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG 828
          |||
Sbjct 902  AAACCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG 949
```


G50 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|GU227670.1](#) Cronobacter sakazakii strain KYU49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1461, Score = 1550 bits (839), Expect = 0.0, Identities = 841/842 (99%), Gaps = 0/842 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGG 60
      |||
Sbjct 108 CTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGG 167

Query 61 ACCAAAGTGGGGGCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAG 120
      |||
Sbjct 168 ACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAG 227

Query 121 TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC 180
      |||
Sbjct 228 TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC 287

Query 181 CACACTGGAAC T GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA 240
      |||
Sbjct 288 CACACTGGAAC T GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA 347

Query 241 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTGTA 300
      |||
Sbjct 348 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTGTA 407

Query 301 AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCG 360
      |||
Sbjct 408 AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCG 467

Query 361 CAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGC AAGCGT 420
      |||
Sbjct 468 CAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGC AAGCGT 527

Query 421 TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATC 480
      |||
Sbjct 528 TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATC 587

Query 481 CCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 540
      |||
Sbjct 588 CCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 647

Query 541 TAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG 600
      |||
Sbjct 648 TAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG 707

Query 601 CGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 660
      |||
Sbjct 708 CGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 767

Query 661 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG 720
      |||
Sbjct 768 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG 827

Query 721 GCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC 780
      |||
Sbjct 828 GCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC 887

Query 781 CAAATGAATTGACGGGGGCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACG 840
      |||
Sbjct 888 CAAATGAATTGACGGGGGCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACG 947

Query 841 CG 842
      ||
Sbjct 948 CG 949
```

G54 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|GU122201.1](#) Cronobacter sakazakii strain 05CHPL48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1507, Score = 1519 bits (822), Expect = 0.0, Identities = 824/825 (99%), Gaps = 0/825 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGG 60
      |||
Sbjct 126 CTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGG 185

Query 61 ACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAG 120
      |||
Sbjct 186 ACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAG 245

Query 121 TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC 180
      |||
Sbjct 246 TAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC 305

Query 181 CACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA 240
      |||
Sbjct 306 CACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA 365

Query 241 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA 300
      |||
Sbjct 366 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA 425

Query 301 AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCCG 360
      |||
Sbjct 426 AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCCG 485

Query 361 CAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGT 420
      |||
Sbjct 486 CAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGT 545

Query 421 TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATC 480
      |||
Sbjct 546 TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATC 605

Query 481 CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 540
      |||
Sbjct 606 CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 665

Query 541 TAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG 600
      |||
Sbjct 666 TAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG 725

Query 601 CGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 660
      |||
Sbjct 726 CGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 785

Query 661 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG 720
      |||
Sbjct 786 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG 845

Query 721 GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCTAGGTTAAAAC 780
      |||
Sbjct 846 GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCTAGGTTAAAAC 905

Query 781 CAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT 825
      |||
Sbjct 906 CAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT 950
```

G58 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|HQ880405.1](#) Cronobacter sakazakii strain G4083 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1462, Score = 1557 bits (843), Expect = 0.0, Identities = 843/843 (100%), Gaps = 0/843 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1 ACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACG 60
      |||
Sbjct 126 ACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACG 185

Query 61 GACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA 120
      |||
Sbjct 186 GACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA 245

Query 121 GTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG 180
      |||
Sbjct 246 GTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG 305

Query 181 CCACACTGGAAGTGAACGCTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC 240
      |||
Sbjct 306 CCACACTGGAAGTGAACGCTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC 365

Query 241 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA 300
      |||
Sbjct 366 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA 425

Query 301 AAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCC 360
      |||
Sbjct 426 AAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTTACCC 485

Query 361 GCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGC AAGCG 420
      |||
Sbjct 486 GCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGC AAGCG 545

Query 421 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGCGGCTCTGTTAAGTCAGATGTGAAAT 480
      |||
Sbjct 546 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGCGGCTCTGTTAAGTCAGATGTGAAAT 605

Query 481 CCCC GGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 540
      |||
Sbjct 606 CCCC GGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG 665

Query 541 GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG 600
      |||
Sbjct 666 GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG 725

Query 601 GCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 660
      |||
Sbjct 726 GCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 785

Query 661 GATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT 720
      |||
Sbjct 786 GATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT 845

Query 721 GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCCAAGGTTAAAAAC 780
      |||
Sbjct 846 GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCCAAGGTTAAAAAC 905

Query 781 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAAC 840
      |||
Sbjct 906 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAAC 965

Query 841 GCG 843
      |||
Sbjct 966 GCG 968
```

G60 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|HQ880327.1](#) Cronobacter sakazakii strain G4062 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1459, Score = 1563 bits (846), Expect = 0.0, Identities = 846/846 (100%), Gaps = 0/846 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1   GGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 60
          |||
Sbjct 122  GGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC 181

Query 61  TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 120
          |||
Sbjct 182  TACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTA 241

Query 121 GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 180
          |||
Sbjct 242  GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA 301

Query 181  CCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 240
          |||
Sbjct 302  CCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATA 361

Query 241  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 300
          |||
Sbjct 362  TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT 421

Query 301  TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTT 360
          |||
Sbjct 422  TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTTGTGGTTAATAACCGCAGCGATTGACGTT 481

Query 361  ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA 420
          |||
Sbjct 482  ACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA 541

Query 421  AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTG 480
          |||
Sbjct 542  AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTG 601

Query 481  AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAG 540
          |||
Sbjct 602  AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAG 661

Query 541  GGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC 600
          |||
Sbjct 662  GGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC 721

Query 601  GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 660
          |||
Sbjct 722  GAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 781

Query 661  ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 720
          |||
Sbjct 782  ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG 841

Query 721  GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTA 780
          |||
Sbjct 842  GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTA 901

Query 781  AAATCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATG 840
          |||
Sbjct 902  AAATCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATG 961

Query 841  CAACGC 846
          |||
Sbjct 962  CAACGC 967
```

G62 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|GU227670.1](#) Cronobacter sakazakii strain KYU49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1461, Score = 1498 bits (811), Expect = 0.0, Identities = 811/811 (100%), Gaps = 0/811 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1 GCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGAC 60
|||
Sbjct 110 GCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGAC 169

Query 61 CAAAGTGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTA 120
|||
Sbjct 170 CAAAGTGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTA 229

Query 121 GGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCA 180
|||
Sbjct 230 GGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCA 289

Query 181 CACTGGAAGTACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA 240
|||
Sbjct 290 CACTGGAAGTACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA 349

Query 241 ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAG 300
|||
Sbjct 350 ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAG 409

Query 301 TACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTAAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCA 360
|||
Sbjct 410 TACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTAAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCA 469

Query 361 GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTA 420
|||
Sbjct 470 GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTA 529

Query 421 ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCC 480
|||
Sbjct 530 ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCC 589

Query 481 CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTGA 540
|||
Sbjct 590 CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTGA 649

Query 541 GAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCG 600
|||
Sbjct 650 GAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCG 709

Query 601 GCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT 660
|||
Sbjct 710 GCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT 769

Query 661 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC 720
|||
Sbjct 770 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC 829

Query 721 TTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCA 780
|||
Sbjct 830 TTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCA 889

Query 781 AATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTG 811
|||
Sbjct 890 AATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTG 920
```

G69 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|GU122214.1](#) Cronobacter dublinensis strain 05CHPL64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1508, Score = 1543 bits (835), Expect = 0.0, Identities = 837/838 (99%), Gaps = 0/838 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACC 60
      |||
Sbjct 129 CCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACC 188

Query 61 AAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAG 120
      |||
Sbjct 189 AAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAG 248

Query 121 GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAC 180
      |||
Sbjct 249 GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAC 308

Query 181 ACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA 240
      |||
Sbjct 309 ACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA 368

Query 241 TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGT 300
      |||
Sbjct 369 TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGT 428

Query 301 ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTAAGGTTAATAACCTTGATCATTGACGTTACTCGCAG 360
      |||
Sbjct 429 ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTAAGGTTAATAACCTTAATCATTGACGTTACTCGCAG 488

Query 361 AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA 420
      |||
Sbjct 489 AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA 548

Query 421 TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC 480
      |||
Sbjct 549 TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC 608

Query 481 GGGCTCAACCTGGGAACGTCATCCGAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAG 540
      |||
Sbjct 609 GGGCTCAACCTGGGAACGTCATCCGAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAG 668

Query 541 AATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG 600
      |||
Sbjct 669 AATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG 728

Query 601 CCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA 660
      |||
Sbjct 729 CCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA 788

Query 661 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCT 720
      |||
Sbjct 789 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCT 848

Query 721 TCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAA 780
      |||
Sbjct 849 TCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAA 908

Query 781 ATGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC 838
      |||
Sbjct 909 ATGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC 966
```

G73 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|HQ880402.1](#) Cronobacter sakazakii strain G3943 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1462, Score = 1194 bits (646), Expect = 0.0, Identities = 646/646 (100%), Gaps = 0/646 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1   TGCCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTGCGGA   60
          |||
Sbjct 129  TGCCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTGCGGA   188

Query 61  CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT   120
          |||
Sbjct 189  CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT   248

Query 121 AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC   180
          |||
Sbjct 249  AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC   308

Query 181  ACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC   240
          |||
Sbjct 309  ACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC   368

Query 241  AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA   300
          |||
Sbjct 369  AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA   428

Query 301  GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGC   360
          |||
Sbjct 429  GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGC   488

Query 361  AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT   420
          |||
Sbjct 489  AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTT   548

Query 421  AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCC   480
          |||
Sbjct 549  AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCC   608

Query 481  CCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGT   540
          |||
Sbjct 609  CCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGT   668

Query 541  AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC   600
          |||
Sbjct 669  AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC   728

Query 601  GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG   646
          |||
Sbjct 729  GGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG   774
```

G77 kodlu izolata ait 16S rRNA kısmi sekans dizisinin gen bankası nükleotit blast sonucu

>[gb|EF088374.1](#) Enterobacteriaceae bacterium v422 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1447, Score = 1537 bits (832), Expect = 0.0, Identities = 834/836 (99%), Gaps = 0/836 (0%), Strand=Plus/Plus

```
Query 1  AACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCA 60
          |||
Sbjct 55  AACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCA 114

Query 61  AGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCT 120
          |||
Sbjct 115  AGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCT 174

Query 121  AGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA 180
          |||
Sbjct 175  WGTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA 234

Query 181  GCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG 240
          |||
Sbjct 235  GCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG 294

Query 241  CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGT 300
          |||
Sbjct 295  CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGT 354

Query 301  AAAGTACTTTTCAGTGAGGAGGAAGGCATGATGCTTAATACGCATCGTGATTGACGTTACT 360
          |||
Sbjct 355  AAAGTACTTTTCAGTGAGGAGGAAGGCATGATGCTTAATACGCATCGTGATTGACGTTACT 414

Query 361  CACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGC 420
          |||
Sbjct 415  CACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCRAGC 474

Query 421  GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAA 480
          |||
Sbjct 475  GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAA 534

Query 481  TCCCCGGGCTCAACCCGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGG 540
          |||
Sbjct 535  TCCCCGGGCTCAACCCGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGG 594

Query 541  GGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA 600
          |||
Sbjct 595  GGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA 654

Query 601  GGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT 660
          |||
Sbjct 655  GGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT 714

Query 661  AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG 720
          |||
Sbjct 715  AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG 774

Query 721  TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAA 780
          |||
Sbjct 775  TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAA 834

Query 781  CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAT 836
          |||
Sbjct 835  CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAT 890
```


ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gökçe POLAT YEMİŞ
Doğum Yeri : Antakya
Doğum Tarihi : 1976
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce ve Fransızca

Eğitim Durumu

Lise : Keçiören Lisesi (1992)
Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü (1997)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı (2001)

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

2001-2003 : Yüzüncüyıl Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (Araştırma Görevlisi)
2003- : Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (Araştırma Görevlisi)

Tez ile ilgili yayınları

Polat, G., Halkman, A.K. 2007. Bebek mamalarında *Enterobacter sakazakii* ve önemi. Gıda 32(3):151-161.

Polat Yemiş, G., Halkman, A.K. 2009. The occurrence of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* spp. in powdered infant formula and its ingredients. IFT Annual Meeting and Food Expo, 6-9 June 2009, Anaheim/OC, CA, USA (poster bildiri).

Polat Yemiş, G., Halkman, A.K. 2010. Development and application of PCR based method for the rapid detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in infant formula.1st International Congress on Food Technology. November 03-06, 2010, Antalya (poster bildiri).