



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

GIDA KAYNAKLI PATOJEN TESPİTİNDE AMPLİFİKASYON
ÜRÜNLERİNİN KOLORİMETRİK BELİRLENMESİ

NAZLI AYYILDIZ

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğretim Üyesi Beste ÇAĞDAŞ

KIRIKKALE-2024



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**GIDA KAYNAKLI PATOJEN TESPİTİNDE AMPLİFİKASYON
ÜRÜNLERİNİN KOLORİMETRİK BELİRLENMESİ**

NAZLI AYYILDIZ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Dr. Öğretim Üyesi Beste ÇAĞDAŞ**

KIRIKKALE-2024

Nazlı AYYILDIZ tarafından hazırlanan “GIDA KAYNAKLI PATOJEN TESPİTİNDE AMPLİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN KOLORİMETRİK BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Beste ÇAĞDAŞ

İmza

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Başkan : Doç. Dr. Cansu Ekin BONACINA

İmza

Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye: Doç. Dr. Zehra GÜN GÖK

İmza

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 25/09/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Recep ÇALIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nazlı AYYILDIZ

31.07.2024

ÖZET

GIDA KAYNAKLI PATOJEN TESPİTİNDE AMPLİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN KOLORİMETRİK BELİRLENMESİ

Kırıkkale Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Beste ÇAĞDAŞ
Ağustos 2024, 45 s.

Bu tez çalışmasında hedef gıda kaynaklı patojene ait asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edilen amplifikasyon ürününün jel elektroforez ile belirlenmesi aşamasına ihtiyaç duyulmadan altın nanoparçacık temelli hızlı teşhisi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle pozitif ve negatif kontrol olarak seçilen gıda kaynaklı hastalıklara neden olan, seçilmiş bakteri suşlarının uygun koşullarda kültürü yapılmış (37°C, nutrient broth) ve kültürlerden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile, etkileştiğinde, altın koloidal süspansiyonu renginde değişikliğe neden olan ve çok düşük konsantrasyonlarda dahi çıplak gözle tespit edilebilen tek zincirli bölgeleri olan PCR ürünleri elde edilmiştir. Çalışmanın son aşamasını gerçekleştirmek amacıyla ise Turkevich yöntemi kullanılarak AuNP'ler sentezlenmiş ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre sentezlenen AuNP'lerin hidrodinamik boyutu 28 nm ve zeta potansiyeli ise -26,4 mV olarak bulunmuştur. SEM ile yapılan analize göre ise parçacıkların yuvarlak morfolojide oldukları ve agregasyona eğilimli olmadıkları tespit edilmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise AuNP/NaCl etkileşiminin, ortama PCR ürünü ilavesi sonrasında çökmeye karşı stabilliği çözelti renginin kırmızı veya mavi renk yoğunluklarına göre akıllı telefon uygulaması yardımı ile (RGB analizine göre) değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, patojen hedef dizisinin, günümüzde yaygın kullanılan diğer yöntemlere göre daha hızlı ve ekonomik bir şekilde kolorimetrik olarak tespiti gerçekleştirilebilmiştir.

Anahtar kelimeler: Altın nanoparçacık, asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu, akıllı telefon uygulaması, gıda kaynaklı patojen, hızlı tespit, kolorimetrik belirleme

ABSTRACT

COLORIMETRIC DETERMINATION OF AMPLIFICATION PRODUCTS IN FOODBORNE PATHOGEN DETECTION

Kırıkkale University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering
Master's Thesis
Supervisor: Dr. Beste ÇAĞDAŞ
August 2024, 45 p.

In this study, gold nanoparticle-based rapid diagnosis of the target foodborne pathogen was achieved without the need for gel electrophoresis determination of the amplification product obtained by asymmetric polymerase chain reaction. For this purpose, selected bacterial strains that cause foodborne diseases, selected as positive and negative controls, were cultured under appropriate conditions (37°C, nutrient broth) and the concentration and DNA samples were obtained sby isolating genomic DNA from the cultures. Then, by asymmetric polymerase chain reaction (PCR), PCR products with single-chain regions were obtained, which, when interacted, cause a change in the color of the gold colloidal suspension and can be detected with the naked eye even at very low concentrations. In order to carry out the last stage of the study, AuNPs were synthesized and characterization was carried out using the Turkevich method. Accordingly, the hydrodynamic size of the synthesized AuNPs was found to be 28 nm and the zeta potential was -26.4 mV. According to the analysis performed with SEM, it was determined that the particles had a round morphology and were not prone to aggregation. In the final stage of the study, the stability of the AuNP/NaCl interaction against precipitation after the addition of the PCR product to the medium was evaluated with the help of a smartphone application (according to RGB analysis) according to the red or blue color intensities of the solution color. As a result, colorimetric detection of the pathogen target sequence was possible faster and more economically than other methods commonly used today.

Keywords: Gold nanoparticle, asymmetric polymerase chain reaction, smartphone application, foodborne pathogen, rapid detection, colorimetric determination

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecimde hiçbir zaman desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli bilgileri ile bana yol gösteren ve arkadaşça davranan kıymetli hocam sayın Dr. Öğretim Üyesi Beste Çağdaş'a, her zaman yanımda olduklarını hissettiren sevgili ailem, kızlarım Ayşe Aslı, Safiyye Bilge ve henüz bir yaşındaki Beril'ime, tez sürecimde bana akademik bilgileri ile de destek olan sabırla davranan değerli eşim Erdem Ayyıldız'a, canım annem Hatice Asan'a ve kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler.....	4
1.1.1. Gıda Kaynaklı Bakteriler	7
1.1.1.1. E. Coli	7
1.1.1.2. Staphylococcus Aureus	8
1.1.1.3. Bacillus Cereus.....	9
1.1.1.4. Campylobacter Jejuni.....	10
1.1.1.5. Clostridium Botulinum.....	10
1.1.2. Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenlerin Tespitinin Önemi	11
1.2. Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenlerin Tespitinde Kullanılan Yöntemler.....	12
1.2.1. Kültür Tabanlı Yöntemler (Kültür-Koloni Sayım Yöntemleri)	14
1.2.2. Biyokimyasal Test Yöntemi.....	15
1.2.3. İmmünoloji Tabanlı Yöntemler.....	15
1.2.4. Nükleik Asit-Tabanlı Yöntemler.....	16
1.2.4.1. Kuyruklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	17
1.2.5. İleri Yöntemler	17
1.2.5.1. Hibridizasyon Tabanlı Yöntem	17
1.2.5.2. Dizi Tabanlı Yöntem.....	18
1.2.5.3. Spektroskopi Tekniği	18
1.2.5.4. Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP).....	19
1.2.5.5. Biyosensör	20

2. MATERYAL ve YÖNTEM	22
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	22
2.1.1. Cihazlar	22
2.1.2. Kimyasallar	22
2.2. Bakterilerin Kültüre Edilmesi ve DNA Ekstraksiyonu	23
2.2.1. Bakterilerin kültüre edilmesi	23
2.2.2. Bakteriyel Kültürlerden DNA İzolasyonu.....	24
2.3. Gen Bölgesi Çoğaltımı İçin Primerlerin Belirlenmesi	24
2.4. Kuyuksuz ve Kuyuklu Primer Setleri ile Gen Bölgesi Çoğaltımı	25
2.5. Modifiye Olmayan Altın Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	25
2.6. Bakteriyel DNA'ların Agaroz Jel ile Görüntülenmesi	26
2.7. Bakteriyel DNA'ların Kolorimetrik Belirlenmesi.....	26
2.8. İstatistiksel Analiz	27
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	28
3.1. Bakteri Kültürü ve DNA Ekstraksiyonu	28
3.2. Kuyuksuz ve Kuyuklu Primer Setleri ile Gen Bölgesi Çoğaltımı	29
3.3. Modifiye Olmayan Altın Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	30
3.4. Bakteriyel DNA'ların Kolorimetrik Belirlenmesi.....	32
4. SONUÇ	35
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Başlıca gıda kaynaklı hastalıkların belirtileri, belirtilerin başlangıcı ve sorumlu mikroorganizmalar veya toksinler	6
2.1. Hedef gen bölgesi çoğaltımında kullanılan primer setleri	25
3.1. Sıvı kültürlerin OD (600 nm)'de okunan absorbands değerleri	29
3.2. Sentezlenen AuNP'lerin hidrodinamik boyutu (nm), boyut dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel (mV) değerleri	31
3.3. Membran üzerindeki örneklere ait akıllı telefon uygulaması ile elde edilen renk yoğunluk değerleri	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Tez çalışması kapsamında uygulanan yöntemin prensibi (A) kuyruklu primerler kullanılarak PCR reaksiyonu ve (B) plastik bir membran ve akıllı telefon görüntüsü üzerinde damla biçiminde gerçekleştirilen, modifiye olmayan altın nano parçacıklarının tuzla indüklenen bir agregasyonuna dayalı okuma	4
1.2. Gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde geleneksel ve ileri yöntemler (Kabiraz ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan alınarak türkçeleştirilmiştir (Kabiraz vd., 2023)).	14
2.1. T çizgi ekim yöntemi ile bakteri ekimi	24
2.2. Hedef gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı	25
3.1. Kültüre edilen bakteriler	28
3.2. Kuyuksuz (1a-4a) ve Kuyruklu (1b-4b) primer setleri ile çoğaltılan hedef gen bölgesinin jel agaroz görüntüsü (DNA ladder-100 bp) 1a- <i>S. mutans</i> , 2a- <i>S. aureus</i> , 3a- <i>E. coli</i> , 4a- <i>E. feacelis</i> , NK. Negatif Kontrol, 1b- <i>S. mutans</i> , 2b- <i>S. aureus</i> , 3b- <i>E. coli</i> , 4b- <i>E. feacelis</i> , NK. Negatif Kontrol)	29
3.3. Sentezlenen AuNP'lerin tüp içerisindeki görünüşü	30
3.4. Sentezlenen AuNP'lerin UV-Vis spektrumu	30
3.5. Sentezlenen AuNP'lerin SEM Görüntüsü	31
3.6. Kuyuksuz (1a-4a) ve Kuyruklu (1b-4b) primer setleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin AuNP ile plastik membran üzerinde etkileşimi (AuNP-Altın nanoparçacık, NK-Negatif Kontrol, 1a- <i>S. Mutans</i> , 2a- <i>S. aureus</i> , 3a- <i>E. Coli</i> , 4a. <i>E. feacelis</i> ., 1b- <i>S. Mutans</i> , 2b- <i>S. aureus</i> , 3b- <i>E. Coli</i> , 4b- <i>E. feacelis</i>)	32

KISALTMALAR

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
AuNP	Altın Nano Partikül
DNA	Deoksiribo nükleik asit
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
SEM	Scanning Electron Microscope
Spp	Tür
pH	Hidrojen derişiminin eksi logaritması
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
EFSA	European Food Safety Authority
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
NGS	Yeni Nesil Dizileme
ELISA	İmmünosorbent Testi
RNA	Ribonükleik asid
rRNA	Ribozomal RNA
UV-Vis	Ultraviyole ve görünür ışık
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
PDI	Boyut Dağılımı
mV	Zeta Potansiyel
mL	Mililitre
mM	Milimol
nm	Nanometre
RGB	Color Detector, Red-Green-Blue

1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı patojenler, insan sağlığı ve ekonomisi üzerinde önemli etkileri olan, dünya genelinde halk sağlığını tehdit ederek çok sayıda hastalığa sebep olan etkenlerdir. Gıda kaynaklı patojenlerin hızlı ve doğru bir şekilde varlığının tespit edilmesi gıda güvenliği ve insan sağlığı için büyük önem arz etmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklar genel anlamda patojen mikroorganizmalar ya da mikrobiyal toksinler ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi ile oluşan ve daha çok gastrointestinal semptomlarla seyreden klinik tablolarıdır (Sağlam ve Şeker, 2016). Bu mikrobiyal kökenli hastalıklar; gıda kaynaklı infeksiyonlar ve gıda kaynaklı mikrobiyal intoksikasyonlar şeklinde ortaya çıkabilmektedir (Sağlam ve Şeker, 2016). Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan çok sayıda bakteri bulunmakla birlikte, en önemlileri: *Staphylococcus aureus*, *Salmomella spp.*, *Campylobacter spp*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli O157:H7*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio spp.*, *Brucella spp.* ve *Aeromonas spp.* olarak bilinmektedir (Sağlam ve Şeker, 2016). Gıda kaynaklı patojenlerin en önemlilerinden birisi de *Staphylococcus aureus* bakterisidir ve bu bakteri gıda teknolojisinde dikkatleri özellikle üzerine çeken bir türdür. *S. aureus* başta ısıtıl işlem olmak üzere mikroorganizmaların bertaraf edilmesine yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek bir duyarlılık gösterir. *S. aureus*'un suşları genellikle gıdalarda gelişerek ısıtıl işleme dayanıklı enterotoksin üreterek gıda zehirlenmelerine neden olur (Bintsis, 2017). *S. aureus*'un termostabil nükleazını kodlayan nük (Nuc) geni de yine araştırmalarda bir belirteç görevi görmektedir ve aynı zamanda ısıya dayanıklı nükleaz geninin varlığı enterotoksin üretimiyle güçlü bir şekilde ilişkilidir ve enterotoksin üreticisi *Staphylococcus aureus* enfeksiyonunun bir göstergesi olarak düşünülmüştür (Brakstad ve Maeland, 1992; Karimzadeh ve Ghassab, 2022). *S. aureus*' un bazı özel direnç mekanizmaları da gıdalarda bulunmasını ve gelişmesini sağlamaktadır. Spor oluşturmadığı halde %15'e kadar NaCl konsantrasyonunda, geniş bir sıcaklık (7 – 48,5°C; optimum 30 - 37°C) ve pH (4,2 – 9,3; optimum 7 – 7,5) aralığında büyüebildiği için, vücut dışında canlılığını uzun süre koruyabilen, gıda hazırlama ve

işleme prosesleri sırasında ürünlerde bulaşa neden olabilen bir patojendir (Bintsis, 2017; Cemek vd., 2021). Bu bakteri türü ayrıca ağır metallere, klinik mikrobiyolojide kullanılan pek çok antimikrobiyal maddeye karşı genetik olarak kazanılmış bir direnç sistemine de sahiptir (Bintsis, 2017). Çevresel enfeksiyon kaynaklarına ek olarak, bazıları *S. aureus* içeren yiyecekler arasında kıyma, domuz sosisi, hindi kıyması, somon bifteği, ıstiridye, karides, kremalı turta, süt ve şarküteri salataları yer alır. *S. aureus*'un sebep olduğu veya ilişkilendirildiği hastalıklar arasında ise çıban, ameliyat sonrası yara enfeksiyonları gibi deriyi tutan enfeksiyonlar, bakteriyemi, pnömoni, osteomyelit, serebrit, menenjit ve ürogenital sistem ve merkezi apseler gibi daha ciddi enfeksiyonlar sayılabilir. Semptomlar ise kusma, mide bulantısı, karın krampları, baş ağrısı, baş dönmesi, titreme, terleme, genel halsizlik, kas krampları, bitkinlik ve kanlı/kanlı olmayan ishali içerebilir. ABD'de stafilokokal gıda zehirlenmesinin her yıl yaklaşık 241.188 hastalığa, 1.064 hastaneye yatışa ve 6 ölüme neden olduğunu tahmin etmektedir (Bintsis, 2017).

Olumsuz etkilere yol açan gıda kaynaklı hastalıkların önüne geçilebilmesi ve potansiyellerinin belirlenebilmesi için hastalığa neden olan mikrobiyal etkenin ve miktarının tanımlanması ve belirlenmesi gerekmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan gıda patojen mikroorganizmaların spesifik ve tekrarlanabilir bir metot ile tanımlanmaları oldukça önemlidir. Dolayısıyla mikrobiyal gıda patojenlerinin tespiti hassas, türe spesifik ve güvenilir bir metot gerektirmektedir. Günümüze kadar bu amaçla birçok yöntem kullanılmıştır. Kültürel, immünolojik ve konvansiyonel PCR metotları patojenlerin tanısında yaygın olarak kullanılmakta ancak özellikle hedef sekansın amplifikasyonunun uzun zaman alması ve genel olarak bu yöntemlerin miktar ile ilgili yeterli bilgi vermemesi gibi sınırlamaları bulunmaktadır (Tutar vd, 2015; Zanolı ve Spoto, 2012). En yaygın kullanılan amplifikasyon yöntemi polimeraz aktivitesine dayalı polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR). Hedef sekans amplifikasyonunu elde etmek için gerekli olan termal döngüye ihtiyaç gibi PCR'in sahip olduğu dezavantajlar PCR'a alternatif farklı amplifikasyon yöntemlerinin gelişmesine yol açmıştır ve sonuç olarak birçok gıda analizinde ihtiyaç duyulduğu gibi, gıda kaynaklı patojenlerin hızlı tespitinde (Sağlam ve Şeker, 2016) deneysel adımları basitleştirmek ve reaksiyon süresini azaltmak, alete ve araştırma teknisyenlerine bağımlılığı azaltmak için nükleik asitlerin çoğaltımı için çeşitli amplifikasyon yöntemleri ve bu ayrıca PCR gibi geleneksel yöntemlerin asimetrik

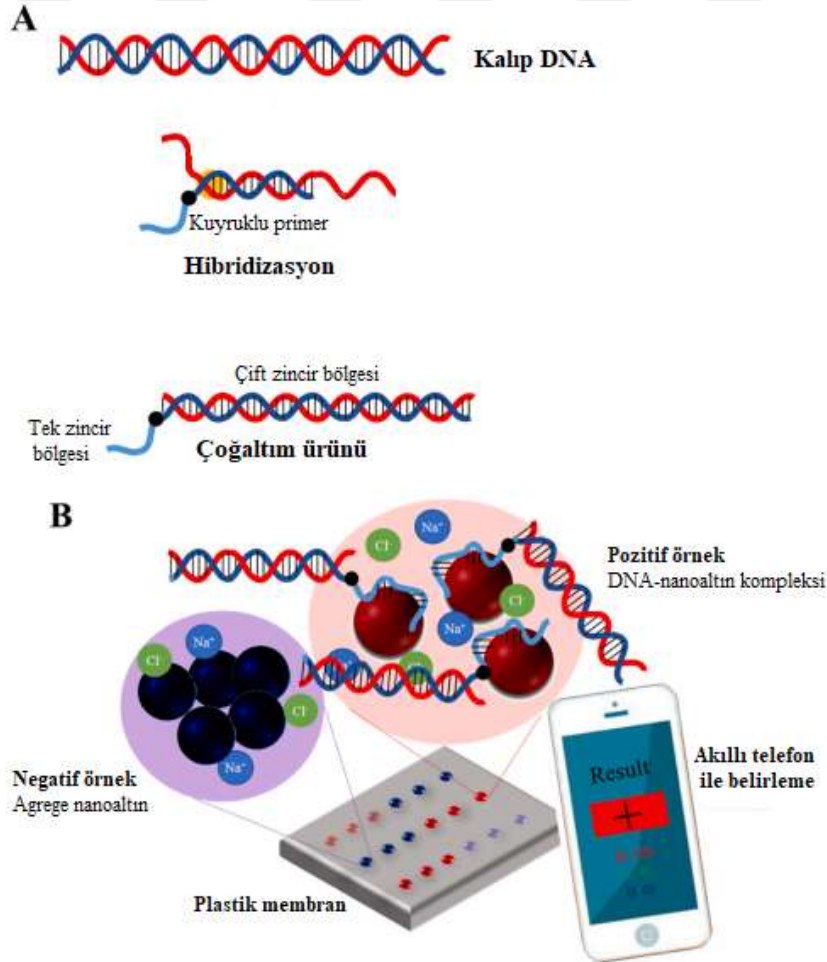
PCR’da olduğu gibi modifikasyon teknikleri geliştirilmiştir (Li vd., 2018; Tortajada-Genaro vd., 2022; Cao vd., 2024). Özellikle son 20 yılda laboratuvar sınırlamalarının aşılması amacıyla önerilen çözümler arasında taşınabilir termal döngüleyiciler, qPCR cihazları, izotermal amplifikasyon tekniklerine dayalı mikroakışkan cihazlar ve floresan olmayan algılama amacıyla geliştirilen nanomateryaller yer almıştır. Bu kapsamda altın nanoparçacıkları (AuNP’ler), kolorimetrik algılama için uygun bir alternatif olarak karşımıza çıkan mükemmel optik transdüktörlerdir (Valentini ve Pompa, 2013). Birçok kolorimetrik yöntemde, AuNP’lerin agregasyonundan yararlanılarak hedef nükleik asitler veya diğer analitler seçici olarak tanınmıştır (Chang vd., 2019). Bu yöntemlerin temel prensibi modifiye edilmemiş nanopartiküllerin doğrudan tuzla indüklenen agregasyonu olmuştur (Li ve Rothberg, 2004) ve bu yöntemlerde başlangıçta adsorbe edilen negatif iyonların (örneğin sitrat) yüksek tuz konsantrasyonlarında itilmesi göröntülenmektedir. AuNP’ler arasındaki güçlü van der Waals çekimi, kolloidal altına kıyasla bir renk değişikliğine yol açar ve biyoalgılama prensibi çeşitli moleküllerin neden olduğu stabilizasyona dayanır. Tek iplikçikli DNA’nın (ssDNA) varlığı bu süreci engellediğinden, modifiye edilmemiş altın parçacıklarına dayalı göröntüleme analizleri gerçekteştirilebilmiştir (Li vd., 2018; Yun vd., 2016). Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda (nM-µM) ssDNA hedefleri varlığında çözeltiler çıplak göz ile tanımlanabilmiştir.

Tüm bu literatür taraması ışığında, gerçekteştirilmiş olan bu tez çalışmasında, gıda güvenliğiyle ilgili proteini kodlayan seçilmiş genin gelişmiş tespiti için kolorimetrik AuNP’lerin aracılık ettiği bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemde adsorpsiyon mekanizması elektrostatik etkileşime dayalı olduğundan parçacıkların veya hedef DNA’nın işlevselleştirilmesine gerek duyulmamıştır. Öte yandan, akıllı telefonlar, özellikle sınırlı laboratuvar imkanlarının olduğu durumlar için DNA analizinin daha da kolay hale getirilmesine imkan tanıdığı için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Deneysel birtakım değişkenler, akıllı telefon kameralarınca yakalanan optik özellikleri değiştirdiklerinden sistem performansını etkilemektedirler. Bu yaklaşım ile elektronik cihaz, elde edilen sonuçların yorumlanmasında analitik bir okuyucuya dönüştürölmüş olmaktadır (Tortajada-Genaro vd., 2022). Dolayısı ile gerçekteştirilmiş olan bu tez çalışmasında gıda kaynaklı patojen tespiti amacıyla hedef olarak seçilen gen bölgesinin PCR amplifikasyon ürünü ve altın nanoparçacık etkileşiminden yararlanılarak akıllı telefon uygulaması ile patojen geleneksel yöntemle

göre daha hızlı bir şekilde tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 1.1.). Böylece akıllı telefon uygulamasının AuNP ve nükleik asit hibritlerini görüntülemedeki uygulanabilirliği de gösterilmiştir.

1.1. Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler

Gıda tüketimi ile insan hastalıkları arasındaki bağlantının tespiti, M.Ö. 460'da Hipokrat'ın bu bağlantıya dikkat çekmesine dayanır (Mead vd., 1999; CDC, 2012). Gıda kaynaklı patojenler (örn. virüsler, bakteriler, parazitler), gıda kaynaklı bir hastalık olayına neden olabilen biyolojik etkenlerdir. Gıda kaynaklı hastalık salgını, ortak bir gıdanın tüketilmesinden kaynaklanan iki veya daha fazla benzer hastalık vakasının ortaya çıkması olarak tanımlanır (Bintsis, 2017; CDC, 2012).



Şekil 1.1. Tez çalışması kapsamında uygulanan yöntemin prensibi (A) kuyruklu primerler kullanılarak PCR reaksiyonu ve (B) plastik bir membran ve akıllı telefon görüntüsü üzerinde damla biçiminde gerçekleştirilen, modifiye olmayan altın nano parçacıklarının tuzla indüklenen bir agregasyonuna dayalı okuma

Gıda kaynaklı hastalık, bir patojen gıda ile tüketildiğinde ve insan konakçıda yerleştiğinde (ve genellikle çoğaldığında) veya toksijenik bir patojen bir gıda ürününde yerleştiğinde ve daha sonra insan konakçı tarafından yutulan bir toksin ürettiğinde meydana gelir. Bu nedenle, gıda kaynaklı hastalık genellikle şu şekilde sınıflandırılır: (a) gıda kaynaklı enfeksiyon ve (b) gıda kaynaklı zehirlenme. Gıda kaynaklı enfeksiyonlarda, genellikle bir kuluçka dönemi söz konusu olduğundan, yutma anından semptomların ortaya çıkmasına kadar geçen süre, gıda kaynaklı zehirlenmelere göre çok daha uzundur.

200'den fazla farklı gıda kaynaklı hastalık tanımlanmıştır (Mead vd., 1999). En şiddetli vakalar genellikle çok yaşlılarda, çok gençlerde, bağışıklık sistemi fonksiyonu zayıflamış kişilerde ve bir organizmanın çok yüksek dozuna maruz kalan sağlıklı kişilerde meydana gelir (CDC, 2012). Başlıca gıda kaynaklı hastalıkların belirtileri, belirtilerin başlangıcı ve en sık sorumlu mikroorganizmalar Çizelge 1.1.'de gösterilmektedir.

Avrupa Birliği'nde (AB) 2015 yılı için 26 üye devlet, su kaynaklı salgınlar da dahil olmak üzere toplam 4.362 gıda kaynaklı salgın bildirilmiştir. 2015 yılında bildirilen salgınların çoğu bakteriyel etkenlerden (tüm salgınların %33,7'si) kaynaklanmıştır. Bakteriyel toksinler ise, gıda ve su kaynaklı salgınlarda etkenler arasında ikinci sırada yer almıştır (EFSA, 2016).

Hastalık etkeninin taşındığı gıdalar çoğunlukla hayvansal kökenliydi, özellikle yumurta ve yumurta ürünleri ve domuz eti (ikisi de tüm salgınların %10'unu oluşturmuştur), piliç eti (%9) ve peynir (%8), ardından balık ve balık ürünleri (%7), süt ve süt ürünleri (%5), sığır eti (%4) ve kabuklular (%3) gelmiştir (FSA, 2016).

Çizelge 1.1. Başlıca gıda kaynaklı hastalıkların belirtileri, belirtilerin başlangıcı ve sorumlu mikroorganizmalar veya toksinler (FDA 2012; IFT 2004)

Semptomların yaklaşık başlangıç süresi	Önde gelen semptomlar	İlişkili organizma veya toksin
1–7 saat, ortalama 2–4 saat	Bulantı, kusma, öğürme, ishal, karın ağrısı, bitkinlik	<i>S. aureus</i> ve enterotoksinleri
8–16 saat (kusma baskınsa 2–4 saat)	İshal veya kusma toksininin mevcut olup olmamasına bağlı olarak kusma veya ishal; karın krampları; mide bulantısı	<i>Bacillus cereus</i> (emetik toksin)
12–48 saat	Bulantı, kusma, sulu, kansız ishal, dehidratasyon	Norovirüs
2–36 saat (ortalama 6–12 saat)	Karın krampları, ishal, bazen mide bulantısı ve kusma	<i>Clostridium perfringens</i>
6–96 saat (genellikle 1–3 gün)	Ateş, karın krampları, ishal, kusma, baş ağrısı	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>E. coli</i>
6 saat - 5 gün	Karın krampları, ishal, kusma, ateş, halsizlik, mide bulantısı, baş ağrısı, susuzluk	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
1–10 (ortalama 3–4) gün	İshal (genellikle kanlı), karın ağrısı, bulantı, kusma, halsizlik, ateş	Enterohemorajik <i>E. coli</i> , <i>Campylobacter</i> spp.
3–5 gün	Ateş, kusma, sulu iltihapsiz ishal	Rotavirüs, Astrovirüs, enterik Adenovirüs
3–7 gün	Ateş, ishal, karın ağrısı	<i>Yersinia enterocolitica</i>
1'den birkaç haftaya kadar	Karın ağrısı, ishal, kabızlık, baş ağrısı, uyumsuzluk, ülserler, değişken-genellikle asemptomatik	<i>Entamoeda histolytica</i>
3–6 ay	Sinirlilik, uykusuzluk, açlık sancıları, iştahsızlık, kilo kaybı, karın ağrısı, bazen gastroenterit	<i>Taenia saginata</i> , <i>Taenia solium</i>
2 saat - 6 gün, genellikle 12–36 saat	Baş dönmesi, çift veya bulanık görme, ışık refleksi kaybı, yutma güçlüğü, ağız kuruluğu, güçsüzlük, solunum felci	<i>Clostridium botulinum</i> ve nörotoksinleri
4–28 gün	Gastroenterit, ateş, göz çevresinde ödem, terleme, kas ağrısı, titreme, bitkinlik, zor nefes alma	<i>Trichinella spiralis</i>
7–28 gün	Halsizlik, baş ağrısı, ateş, öksürük, mide bulantısı, kusma, kabızlık, karın ağrısı, titreme, kırmızı lekeler, kanlı dışkı	<i>Salmonella Tympi</i>
10–13 gün	Ateş, baş ağrısı, miyalji, döküntü	<i>Toxoplasma gondii</i>
Değişen periyotlar	Ateş, titreme, baş ağrısı, eklem ağrısı, bitkinlik, halsizlik, şişmiş lenf düğümleri ve söz konusu hastalığın diğer spesifik belirtileri	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>

1.1.1. Gıda Kaynaklı Bakteriler

Bakteriler gıda kaynaklı hastalıkların en yaygın nedenidir ve çeşitli şekil, tip ve özelliklerde bulunurlar. Bazı patojenik bakteriler spor oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu nedenle yüksek ısıya dayanıklıdır (örn. *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* (Bacon ve Sofos, 2003). Bazıları ısıya dayanıklı toksinler üretme yeteneğine sahiptir (örn. *S. aureus*, *Clostridium botulinum*). Çoğu patojen 20°C ile 45°C arasında optimum büyüme sıcaklığı aralığına sahip mezofiliktir. Bununla birlikte, *Listeria monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica* gibi belirli gıda kaynaklı patojenler soğutulmuş koşullar altında veya 10°C'den düşük sıcaklıklarda büyüme yeteneğine sahiptir (Bacon ve Sofos, 2003).

1.1.1.1. E. Coli

Escherichia coli, gram negatif, spor oluşturmeyen çubuk görünümlü bir bakteridir. Hareketli veya hareketsiz, ayrıca, kamçılı veya kamçısızdır (Mitscherlich ve Marth, 1984). Organizma, fakültatif bir anaerobdur ve laktik, asetik ve formik asitler oluşturmak için glikoz gibi basit şekerleri fermente etme özelliğinde olup büyüme için optimum pH'sı 6,0 ile 8,0 aralığındadır (Mitscherlich ve Marth, 1984).

E. coli, büyük ve çeşitli bir bakteri grubudur. *E. Coli*'nin çoğu suşu zararsız olsa da bazı suşları, onları insanlar için patojenik hale getiren toksin üretimi gibi özellikler edinmiştir (Garcia vd., 2010). NCBI'dan alınan verilere göre şu ana kadar 5351 genom tamamlanmıştır (NCBI, 2017). *E. coli*'nin patojenik varyantları dünya çapında çok fazla morbidite ve mortaliteye neden olur; Bu varyantların birçoğu, düşük bulaşıcı dozlara sahip olmaları ve yiyecek ve su gibi her yerde bulunan ortamlar aracılığıyla bulaşmaları nedeniyle önemli bir halk sağlığı endişesidir (Croxen vd., 2013). *E. coli*'nin bulaşması, enfekte insan veya hayvanların dışkılarıyla kirlenmiş yiyecek veya suyun tüketilmesiyle gerçekleşir. Hayvansal ürünlerin kirlenmesi genellikle hayvanların kesimi ve işlenmesi sırasında meydana gelir (Garcia vd., 2010). Sığır veya diğer hayvanların gübresinin tarımsal ürünler için gübre olarak kullanılması, ürünleri ve sulama suyunu kirletebilir (Garcia vd., 2010). *E. coli* çevrede uzun süreler yaşayabilir ve sebzelerde ve diğer yiyeceklerde çoğalabilir.

Patojenik *E. coli*, patojenik mekanizmaya göre altı gruba ayrılmıştır:

(1) Enteropatojenik *E. coli* (EPEC);

(2) Enterohemorajik *E. coli* (EHEC, Shiga toksini üreten *E. coli* [STEC] olarak da bilinir ve daha önce verotoksin üreten *E. coli* [VTEC] olarak adlandırılırdı);

(3) Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC);

(4) Enteroagregatif *E. coli* (EAggEC);

(5) Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC); ve

(6) Bağlayıcı ve Ezik *E. coli* (A/EEC) (Garcia vd., 2010; Croxen vd., 2013). STEC suşu O157:H7'nin her yıl 63.000 hastalığa, 2.100 hastaneye yatışa ve 20 ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir. Taze ürünler de dahil olmak üzere çok çeşitli gıdaların *E. coli* O157:H7 salgınlarının taşıyıcısı olarak hizmet ettiği bilinmektedir (Scallan vd. 2011).

1.1.1.2. Staphylococcus Aureus

Staphylococcus aureus, tek tek veya çiftler, tetradlar, kısa zincirler veya karakteristik “üzüm benzeri” kümeler halinde görülen hareketsiz, gram pozitif koklardır. *Staphylococcus saccharolyticus* ve *S. aureus* subsuşu *anaerobius* hariç, stafilokoklar aerobik koşullar altında daha hızlı büyüyen fakültatif anaeroblardır (Bacon ve Sofos, 2003). *Staphylococcus* spp. doğada yaygındır ve enfekte konakçıların ağız, kan, meme bezleri ve bağırsak, genitoüriner ve üst solunum yollarına ek olarak memelilerin ve kuşların derisinde ve deri bezlerinde bulunabilir (Bacon ve Sofos, 2003). *S. aureus* vücut dışında, kuru bir durumda uzun süreler yaşayabilir ve havadan, tozdan, kanalizasyondan ve sudan izole edilebilmiştir, bu da onu spor oluşturmeyen en dirençli patojenlerden biri yapar (FDA, 2012). Çevresel enfeksiyon kaynaklarına ek olarak, bazıları *Staph. S. aureus* içeren gıdalar arasında kıyma, domuz sosisi, hindi kıyması, somon biftekleri, istiridye, karides, kremalı turtalar, süt ve şarküteri salataları yer almaktadır (Bacon ve Sofos, 2003). *S. aureus*, suşa bağlı olarak 7 - 47,8°C arasındaki sıcaklıklarda büyüebilirken 10 - 46°C arasında enterotoksin üretir ancak 40 - 45°C arasındaki optimum sıcaklığı tercih eder. Bakteri pH 4,5 - 9,3 arasında büyüebilirken optimum pH'sı 7,0 - 7,5 arasındadır ve yüksek tuz seviyelerine (>%10 sodyum klorür)

karşı çok dayanıklıdır (FDA, 2012; Bacon ve Sofos, 2003; ICMSE. 1996). *S. aureus* genellikle çıban, selülit, impetigo ve ameliyat sonrası yara enfeksiyonları gibi cildi ilgilendiren enfeksiyonlara neden olur, ancak bakteriyemi, zatürre, osteomyelit, serebrit, menenjit ve kas, ürogenital sistem, merkezi sinir sistemi ve çeşitli karın organlarının apseleri gibi daha ciddi enfeksiyonlarla da ilişkili olabilir (Bacon ve Sofos, 2003).

S. aureus'un gıdalarda bulunması, enterotoksin üretme kabiliyeti ve sonrasında gıda zehirlenmesi riski nedeniyle halk sağlığı açısından oldukça tehlikelidir. A, B, C1, C2, C3, D, E, F ve G olarak adlandırılan dokuz tanımlanmış stafilokokal enterotoksin olmasına rağmen, salgınların çoğundan A ve D tipleri sorumludur (Mossel vd., 1995). Stafilokokal enterotoksinler, süperantijenler olarak hareket etme ve böylece olağanüstü yüksek oranda T hücresi uyarma gibi benzersiz bir yeteneğe sahip olan pirojenik toksinler olarak bilinen daha geniş bir toksin ailesine dahildir. Bunları ısıyla etkisiz hale getirmek zordur çünkü bunları etkisiz hale getirmek için gereken sıcaklıklar organizmayı öldürmek için gerekenlerden daha yüksektir (Bacon ve Sofos, 2003).

1.1.1.3. *Bacillus Cereus*

Bacillus cereus, *Bacillaceae* ailesinin üyelerinden olup gram pozitif ve hareketli çubuk görünümünde, spor oluşturma yeteneğine sahip bakterilerdir (Bacon ve Sofos, 2003). Çoğu *Bacillus spp.* toprak, tatlı ve deniz suyu gibi ortamlar dahil olmak üzere birçok yerde bulunur. *B. cereus* tarafından üretilen sporlar uzantılara sahiptir ve diğer tüm *Bacillus* sporlarından daha hidrofobiktir. Bu özellikler, sporların birçok farklı yüzeye yapışmasını ve temizlik ve sanitasyon sırasında uzaklaştırılmaya direnmesini sağlar (Rajkowski KT, Smith, 2001). *B. Cereus*'un vejetatif hücreleri 4–15 ila 35–55°C arasındaki sıcaklıklarda büyür ancak suşa bağlı olarak 30–40°C'yi tercih eder (Andersson vd. 1995).

B. cereus emetik (kusma) ve ishal toksini olmak üzere iki tip toksin üretir ve bunlar iki tip hastalığa neden olur. Emetik sendrom, bakterilerin gıdada büyüme evresi sırasında ürettiği emetik toksin tarafından oluşur. İshal sendromu, bakterilerin ince bağırsakta büyümesi sırasında üretilen ishal toksinleri tarafından oluşur. Emetik tipin hızlı başlangıcı mide bulantısı ve kusma ile karakterize edilirken, ishal tipinin geç başlangıcı ishal ve karın ağrısı ile karakterize edilir. Her iki sendrom da *B. cereus*

endosporlarının pişirme sürecinden sağ çıkması ve ardından depolama sırasında bir noktada vejetatif hücrelerin çimlenmesi ve ardından çoğalmasının meydana gelmesi sonucudur. *B. cereus* ishalleri gıda zehirlenmesine sıklıkla karışan gıdalar arasında et ürünleri, çorbalar, sebzeler, pudingler, soslar, süt ve süt ürünleri bulunur (Rajkowski ve Smith, 2001).

1.1.1.4. *Campylobacter* *Jejuni*

Campylobacter türleri, *Campylobacteraceae* ailesinin üyeleridir ve *Campylobacter jejuni* ishalleri hastalıklarının en yaygın nedenlerinden biridir. *C. jejuni*, ABD’de her yıl yaklaşık 850.000 hastalığa, 8.500 hastaneye yatışa ve 76 ölüme neden olmaktadır (Scallan vd. 2011). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Batı Avrupa nüfusunun yaklaşık %1’inin her yıl kampilobakterlerle enfekte olacağını tahmin etmektedir (Humphrey vd., 2007). Doğada yaygın olarak bulunan *C. jejuni*, hem memelilerin hem de kuşların bağırsaklarında kolonize olabilir ve insanlara bulaşma, kontamine gıda ürünleri yoluyla gerçekleşir. Sistemik enfeksiyonlar da daha ciddi hastalıklara neden olarak meydana gelebilir (NCBI, 2017). *Campylobacter* türleri, 18 tür, 6 alt türe sahip küçük (0,2–0,9 µm genişliğinde ve 0,2–5,0 µm uzunluğunda), spiral biçimli, gram negatif bakterilerdir (Humphrey vd., 2007). 2015 yılında *Campylobacter*, AB’de insanlarda en sık bildirilen gastrointestinal bakteriyel patojen olmaya devam etmiş ve 2005’ten beri de bu değişmemiştir (Authority vb., 2016)

Campylobacter türleri, sığır, koyun, keçi, domuz, tavuk, ördek, kaz, yabani kuşlar, köpekler, kediler, kemirgenler ve deniz memelileri dahil olmak üzere çok çeşitli sağlıklı evcil ve vahşi hayvanların normal bağırsak florasının bir parçasıdır ve genellikle su oluklarında ve akarsularda su kütleleriyle ilişkili olarak bulunur. Kampilobakteriyozis vakalarının çoğu, çiğ veya az pişmiş kümes hayvanı eti, pastörize edilmemiş süt, kirli su veya bu maddeler tarafından diğer yiyeceklerin çapraz kontaminasyonu ile ilişkilidir. (Schaffner vd., 2004)

1.1.1.5. *Clostridium* *Botulinum*

Clostridium türleri, *Bacillaceae* ailesinin üyeleri olan spor oluşturan bakterilerdir ve havanın varlığında spor oluşturmayan ve en azından büyümenin erken evrelerinde genellikle Gram pozitif olan zorunlu anaerobik veya aerotolerant, çoğunlukla çubuk görünümlü bakterilerdir. *Clostridia* en yaygın olarak toprakta ve hayvanların bağırsak

sisteminde bulunur. Birçok türün endosporları son derece sağlamdır ve suda uzun süre kaynamaya dayanıklıdır. Sporlar, anaerobik ve organik substratların varlığı gibi vejetatif büyüme için uygun koşullar altında çimlenir (Bacon ve Sofos, 2003). Genellikle örneklenen gıda kaynakları arasında, 1 yaşından küçük bebeklere verilmemesi gereken balın yanı sıra balık, et, sebze ve bebek mamaları bulunur. Konserve mısır, biber, yeşil fasulye, çorba, pancar, kuşkonmaz, mantar, olgun zeytin, ıspanak, ton balığı, tavuk ve tavuk ciğeri, ciğer ezmesi, et, jambon, sosis, doldurulmuş patlıcan, ıstakoz ve tütsülenmiş ve tuzlanmış balık gibi çeşitli gıdalar botulinum toksini ile ilişkilendirilmiştir (FDA, 2012). Geleneksel olarak, gıda kaynaklı botulizm, az işlenmiş ve kötüye kullanılmış sosisler veya evde konserve edilmiş gıdalarla ilişkilendirilmiştir; ancak son yıllarda botulizm, patates salatası, sotelenmiş soğan, sarımsak sosu, peynir, yoğurt, fasulye ezmesi ve zeytin gibi kirlenmiş gıdaların tüketilmesi yoluyla edinilmiştir. Botulinum nörotoksini alımının belirtileri, kontamine gıdanın tüketilmesinden 12-36 saat sonra ortaya çıkar ve başlangıçta mide bulantısı ve kusmayı içerebilir (Çizelge 1.1.). Ancak, bu belirtileri görme bozukluğu ve yüz, baş ve yutak kaslarından başlayıp toraks ve ekstremiteler kaslarına doğru inen ve üst solunum yolu veya diyafram felci nedeniyle solunum yetmezliğinden olası ölüme yol açan akut gevşek felç dahil olmak üzere daha karakteristik nörolojik belirtiler izler (Bacon ve Sofos, 2003).

1.1.2. Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenlerin Tespitinin Önemi

Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler dünya çapında önemli halk sağlığı riskleri oluşturmakta ve hastalıklara, hastaneye yatışlara ve hatta ölümlere yol açmaktadır. Bu patojenlerin etkili bir şekilde tespiti, gıda güvenliğini sağlamak, halk sağlığını korumak ve tüketici güvenini sürdürmek için oldukça önemlidir. *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter* türleri gibi bakteriyel patojenlerin neden olduğu gıda kaynaklı hastalıklar, küresel morbidite ve mortalitenin en büyük nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, her yıl yaklaşık 600 milyon kişi kirli gıdalardan dolayı hastalanmakta ve bunun sonucunda 420.000 ölüm gerçekleşmekte ve bakteriler de bu durumun birincil suçlusu olarak görülmektedir (WHO, 2020). Gelişen erken tespit teknolojileri ile, izleme ve halk sağlığı uyarıları gibi zamanında müdahalelere olanak tanınmakta ve hastalık sıklığını

ve ilişkili sağlık hizmetleri maliyetlerini önemli ölçüde azaltmaktadır (Scallan vd., 2011).

Gıda endüstrisinde, bakteriyel patojenlerin titizlikle tespiti, gıda güvenliği standartlarını ve düzenleyici uyumluluğu korumak açısından oldukça önemlidir. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) gibi düzenleyici kurumlar, gıda işleme ortamlarında kontaminasyonu belirlemek ve çapraz kontaminasyonu önlemek için sıkı test protokollerini zorunlu kılmıştır (FDA, 2021). Düzenli testler ile yalnızca uyumluluk garantilenmekle kalmaz, aynı zamanda belirli bir markayla bağlantılı salgınlar tüketici güvenine uzun vadeli zarar verebileceğinden marka itibarı da korunmakta (Law vd., 2015) ve gıda endüstrisinin güvenlik standartlarının sürdürülmesi de desteklenmektedir.

Tespit teknolojilerindeki gelişmeler, gıda kaynaklı patojenleri hızlı ve doğru bir şekilde tespit etme yeteneğini büyük ölçüde artırmıştır. PCR ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) gibi yöntemler, yüksek hassasiyet ve özgüllük sunarak bakteriyel patojenlerin hızlı bir şekilde tanımlanmasını ve kantifikasyonunu mümkün kılmaktadır (Quainoo vd., 2017). Ayrıca, gelişen biyosensör teknolojileri ile taşınabilir, gerçek zamanlı tespit mümkün hale geldiğinden bu teknolojiler de saha uygulamaları için oldukça kullanışlı hale gelmiştir (Lazcka vd., 2007).

Gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerin tespiti, gıda güvenliği yönetiminin kritik bir bileşenidir. Etkili ve hızlı tespit sayesinde hastalıklar ve salgınlar önlenerek halk sağlığını korumaktadır. Gıda kaynaklı patojenlerin ortaya çıkardığı gelişen zorlukları aşabilmek için tespit yöntemlerinin sürekli iyileştirilmesi ve uygulanması gerekmektedir. Bu teknolojik gelişmeler, gıda güvenliği uygulamalarını iyileştirmek ve gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerle ilişkili riskleri azaltmak için hayati öneme sahiptir.

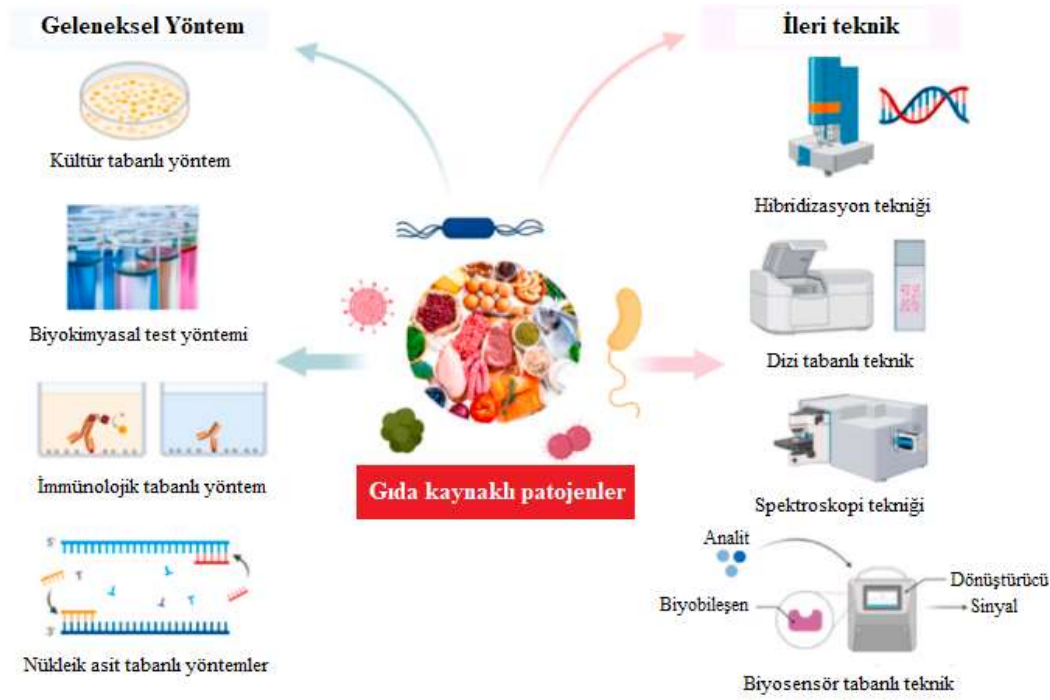
1.2. Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenlerin Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerin tespiti, gıda güvenliğinin sağlanmasında oldukça önemlidir ve tespit doğruluğunu ve hızını artırmak için günümüze kadar farklı teknikler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında kültür tabanlı yöntemler, biyokimyasal yöntemler, nükleik asit tabanlı yöntemler PCR, multipleks PCR, gerçek zamanlı PCR,

kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) ve ters transkriptaz PCR), immünolojik tabanlı yöntemler (enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA), lateral akışlı immünoassay, immünomanyetik ayırma testi ve immünofloresan testi) ve ultrason tekniği gibi birçok geleneksel yöntem sayılabilir (Şekil 1.2.) (Kabiraz vd. 2023). Altın standart olarak kabul edilen geleneksel kültür tabanlı yöntemler, bakterileri seçici ortamlarda büyütmeyi ve biyokimyasal testler yoluyla tanımlamayı içerir. Güvenilir olsa da, bu yöntemler zaman alıcı ve emek yoğun olup, genellikle sonuç elde etmek için birkaç gün gerektirir (Law vd., 2015). Dolayısıyla bu sınırlamalar, daha hızlı ve daha hassas tekniklerin geliştirilmesini sağlamıştır.

PCR ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) gibi varyantları, gıda örneklerinde bakteriyel DNA'nın hızlı ve spesifik bir şekilde tanımlanmasını sağlayarak patojen tespitinde devrim yaratmıştır. PCR tabanlı yöntemler ile, düşük seviyelerde patojenler yüksek hassasiyet ve özgüllükle tespit edilebilmekte ve kültür tabanlı yöntemlere kıyasla tespit için gereken süre önemli ölçüde azalmaktadır (Quainoo vd., 2017). Ayrıca, Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojileri, gıdalarda bulunan mikrobiyal topluluklar hakkında kapsamlı bilgiler sunarak hem bilinen hem de yeni ortaya çıkan patojenlerin tespitine olanak tanımaktadır. NGS kullanan metagenomik yaklaşımlar patojen ekolojisi ve iletim dinamikleri hakkında da değerli bilgiler sağlamaktadır (Quainoo vd., 2017).

Biyosensör teknolojisi ve nükleik asit dizisi tabanlı tespit teknikleri (DNA mikrodizi, DNA hibridizasyonu, spektroskopik teknik, enstrüman tabanlı yöntemler, aptamer tabanlı yöntem, döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) tabanlı yöntem ve metagenomik analiz) gibi çok sayıda gelişmiş yöntem de özellikle yerinde test için oldukça faydalı olan taşınabilir ve gerçek zamanlı tespit sistemleri olarak patojen tespiti amacıyla tanıtılmıştır. Bu cihazlar genellikle belirli patojenleri hızlı ve doğru bir şekilde tespit etmek için immünolojik veya nükleik asit bazlı tanıma öğeleri kullanmaktadır (Lazcka vd., 2007). Biyosensörler, birden fazla patojeni aynı anda tespit edecek şekilde tasarlanabildiğinden gıda güvenliği izleme için çok yönlü bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu gelişmiş yöntemlerin rutin gıda güvenliği uygulamalarına entegre edilmesi ile hem kontaminasyon riskleri derhal tespit edilebilmekte hem de bu riskler azaltılarak genel halk sağlığı korunmaktadır.



Şekil 1.2. Gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde geleneksel ve ileri yöntemler (Kabiraz ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan alınarak türkçeleştirilmiştir (Kabiraz vd., 2023).

1.2.1. Kültür Tabanlı Yöntemler (Kültür-Koloni Sayım Yöntemleri)

Kültür tabanlı yöntem, kontamine gıdalardaki gıda kaynaklı patojenlerin varlığını doğrulayan en eski tekniktir. Seçici ve farklı kültürleme, doğrulama ve suş tiplendirmesinden oluşan ardışık bir kültürel zenginleştirme yöntemidir (Kim ve Kim, 2021). Kültür koşulu, ortamdaki çeşitli besinlere, inkübasyon süresine, sıcaklığa ve atmosfere bağlıdır (Lagier vd., 2015).

Kültür tabanlı yollarla gıda kaynaklı patojenlerin tespiti seçici ve ayırt edicidir, bu da gereksiz mikroorganizmaların büyümesini söndürür ve hedeflenen patojenik mikroorganizmaları tanımlamak için diferansiyel bir ortam kullanılır. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, mikroorganizmaların daha yavaş büyümesi nedeniyle zaman alıcı olmasıdır; kültürlenmesi 18-24 saat veya birkaç gün sürebilir ve emek yoğunudur (Kabiraz vd., 2023).

1.2.2. Biyokimyasal Test Yöntemi

Biyokimyasal test, bileşiklerin patojenlerin varlığını gösteren ve rekabet eden mikropların büyümesini engelleyen sinyaller olarak kullanıldığı büyümeyi teşvik eden bir yöntemdir. Bazen patojenin katı veya sıvı bir kültür ortamında inkübe edildiği bir kültür yöntemi tekniğini içerir (Singh vd., 2013). Gıda örneklerinde belirli patojenlerin varlığını doğrulayan birçok biyokimyasal test vardır. Bunlar oksidaz testi, katalaz testi, indol üretim testi, metil kırmızısı, üçlü şeker demir agarı, kanlı agar plakaları, hareketlilik agarı, mannitol tuz agarı, nişasta hidroliz testi, galaktoz hidroliz testi, karbonhidrat fermantasyonu, sitrat kullanımı, üreaz testi, hidrojen sülfür üretim testi, nitrat indirgeme testi, optokin duyarlılık testi ve basitrasin duyarlılık testidir (Saravanan vd., 2021). Balık ve karideslerden izole edilen laktik asit bakterileri (LAB), farklı enzimler, asitler, amonyak, indol ve gaz üreterek tanımlanabilmiştir (Nair ve Surendran, 2005). Alkoller, yağ asitleri, ketonlar, hidrokarbonlar ve aromatik bileşikler gibi uçucu bileşikler de patojenleri tespit etmek amacıyla kullanılmıştır (Kabiraz vd., 2023). Uçucu bileşik analizi de doğrudan gıda örneklerindeki patojenleri tespit etmek için uygulanabilmiştir (Tait vd., 2014). Ayrıca, etanol ve asetik asit gibi uçucu bileşikler aracılığıyla da konserve domateslerde *Saccharomyces spp.*, *E. coli* ve *Aspergillus spp.* tespit edilebilmiştir (Bianchi vd., 2009). Uçucu bileşiklerin analizi için katı faz mikroekstraksiyon (SPME), gaz kromatografisi ve kütle spektrometrisi gibi yöntemler de kullanılmıştır (Filipiak vd., 2012).

1.2.3. İmmünoloji Tabanlı Yöntemler

Gıda kaynaklı patojenlerin immünolojik tabanlı tespiti, belirli bir antijenin belirli bir antikora (monoklonal veya poliklonal antikor) bağlandığı antikor-antijen etkileşimleridir. Monoklonal antikorlar, özgüllükleri, duyarlılıkları, tekrarlanabilirlikleri ve güvenilirlikleri nedeniyle patojenlerin seçici tespiti için poliklonal antikorlardan daha uygundur (Zhao vd., 2014). Bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü, belirli bir antijene bağlanan antikorun epitop pozisyonuna dayanır. Patojenleri ve toksinlerini (yani mikotoksini) tespit etmek için kültür tabanlı yöntemle kıyasla hızlı ve sağlam bir yöntemdir (Cho vd., 2015; Wang ve Salazar, 2016). Patojenin protein toksinini ve protein, glikoprotein ve patojen büyümesiyle ilişkili polisakkaritler gibi metabolik maddeleri tespit eder (Valderrama vd., 2016). Bu analiz pahalı olmakla birlikte, ön zenginleştirme adımları gerektirir ve diğer patojen

antijenleriyle çapraz reaksiyon yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir ve hasarlı patojen tespit edilemeyebilir (Wang ve Salazar, 2016). Gıdalardaki patojenin tespiti için kullanılan çeşitli immünolojik yöntemler vardır. Bunlara örnek olarak enzim bağlantılı immünoabsorbent testi (ELISA), lateral akışlı immünoassay, immünofloresan testi, immünomanyetik ayırma, lateks aglütinasyonu, immünodifüzyon testleri, immünokromatografik test, immünooglobulin G (IgG) testi ve altın etiketli immünoabsorbent testi (GLISA) verilebilir.

1.2.4. Nükleik Asit-Tabanlı Yöntemler

Nükleik asit amplifikasyonu, belirli patojen genomlarını (DNA/RNA) tanımlamaya ve niceliklendirmeye dayalı moleküler bir yöntemdir. Hızı, hassasiyeti, doğruluğu, özgüllüğü, sağlamlığı, kontaminasyon riskinin en aza indirilmesi ve gıda örneklerinde az miktarda hedef nükleik asidi tanımlama kapasitesi nedeniyle gıda patojenleri için diğer geleneksel tespit yöntemlerine göre daha çok tercih edilmektedir (Salazar vd., 2015). Bu yöntemin temel prensibi, termal döngü cihazlarında tampon sistemlerinin ve replikasyon için belirli primer setlerinin kullanıldığı denatürasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere üç farklı sıcaklık adımının izlenerek çeşitli patojen genomlarının çoğaltılmasıdır. Agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyama gibi yöntemler ile nükleik asit ürünleri tespit edilir (Li vd., 2020). Nükleik asit tabanlı tespit yöntemindeki ilk adım, patojenleri tespit etmek için kullanılan belirli dizileri seçmektir. Bakterinin hedef dizisini seçmek için belirli dizilere sahip korunan bir gen kullanılır (Medici vd., 2015). Ribozomal diziler, bakteriyel ribozomal RNA (rRNA) operonu, 16S rRNA, 23S rRNA geni ve bir genler arası aralayıcı (IGS) bölgesi içeren tespit gelişimi için hedef diziler olarak yaygın olarak kullanılır. Genellikle, 16S rRNA geni moleküler bakteriyel tespit için hedeflenir (Sachse, 2004; Toranzo vd., 2005). Virüs tespiti için hedef dizi, kılıf proteini geni, DNA polimeraz geni veya RNA polimeraz genidir (Ishioka vd., 2005). Bazen RNA virüsleri mutasyona eğilimlidir ve korunmuş dizileri yoktur, bu da gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde zorluk yaratır (Belshaw vd., 2008). Nükleik asit bazlı bir yöntem, zamanında izleme ve etkili gözetim gerektirir. Ayrıca bu yöntemde gıda parçacıklarının tekniği engellemesi ve DNA'nın canlı hücrelerden mi yoksa ölü hücrelerden mi kaynaklı olduğunun tespit edilememesi gibi bazı zorluklar da vardır. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için, nükleik asit bazlı yöntemin geliştirilmesi gerekmiştir. Bu doğrultuda hedef olmayan dizileri

çoğaltmayan iyi tasarlanmış primer setleriyle çalışmanın önemi anlaşılmıştır (Law vd., 2015). Yine bu amaçla zaman içerisinde yuvalanmış polimeraz zincir reaksiyonu (nested-PCR), gerçek zamanlı PCR (real-time PCR), kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR), ters transkriptaz PCR (RT-PCR), gerçek zamanlı ters transkripsiyon PCR (Rti-RT-PCR), multipleks PCR (Amani vd., 2015) gibi farklı nükleik asit amplifikasyon bazlı yöntemler de geliştirilmiştir.

1.2.4.1. Kuyruklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kuyruklu PCR, PCR da kullanılan primerlere kalıp DNA'ya spesifik olmayan dizilerin (kuyrukların) eklenmesini içerir. Bu kuyruklar, nanopartiküller veya diğer moleküllerle sonraki etkileşimleri kolaylaştıran belirli dizileri içerecek şekilde tasarlanabilir. Fonksiyonelleştirme ve tespitin geliştirilmesi amacıyla son yıllarda tercih edilen bir yöntemdir. Fonksiyonelleştirme amacıyla PCR ürünlerine eklenen kuyruklar, nanopartiküllere bağlanmayı sağlayan dizileri içerebilir ve kolorimetrik tespit analizlerinin verimliliğini artırabilir. Ayrıca kuyruklu PCR ürünleri, hedef analitlerin güvenilir kolorimetrik tespiti için çok önemli olan daha iyi stabilite ve bağlanma özgülüğü sağlayabilmektedir (Shuldiner vd., 1989; Hayashi ve Yandell, 1993).

1.2.5. İleri Yöntemler

1.2.5.1. Hibridizasyon Tabanlı Yöntem

Hibridizasyona dayalı yöntem, patojenlerin spesifik genlerinin varlığını tespit etmek için tamamlayıcı DNA ve RNA dizilerine dayanan gelişmiş bir moleküler yöntemdir. Problar olarak adlandırılan sentetik tamamlayıcı DNA parçaları (tek veya çift sarmallı), floresan boyalarla etiketlenir ve spesifik patojenlerin nükleik asidini hedeflemek için kullanılır (Zhang vd., 2018). Amplifikasyondaki varlığının sinyaline göre patojeni tespit etmek için hızlı, kararlı ve hassas bir floresan tabanlı tespit yöntemidir (Yu vd., 2019). Hibridizasyon, florometrik (Zhong, 2018), kolorimetrik (Zhu vd., 2018), elektrokimyasal (Manzano vd., 2018) ve kemilüminesans (Shang vd., 2020) analizinde kullanılabilir. Bu yöntemde, problarla uzun çentikli DNA'nın çift sarmalını oluşturmak için bir kaskad reaksiyon yoluyla iki saç tokası üretilir. Modifiye saç tokası probları, patojenlerin varlığını belirtmek için hibridize ürünle bağlanırken sinyaller üretir (Zeng vd., 2021). Konu ile ilgili hazır gıdalar üzerinde yapılan bir

çalışmada, *Listeria monocytogenes*, iki problu (MNP250-prob1 ve MNP30-prob2) manyetik DNA tabanlı bir hibridizasyon reaksiyonuna dayanan bir yöntem ile 22 saat içerisinde 50 CFU/mL'lik bir tespit limiti ile belirlenebilmiştir (Qi vd., 2021). Marul üzerinde yapılan bir diğer çalışmada *Salmonella spp*, iki ayrı FAM (H1-FAM ve H2-FAM) etiketli DNA saç tokası problu Fe₃O₄ manyetik boncukları kullanılarak $6,9 \times 10^2$ CFU/g tespit limiti ile belirlenebilmiştir (Yu vd., 2019).

1.2.5.2. Dizi Tabanlı Yöntem

Dizi tekniğinde patojen, biyomoleküllerin katı substrat yüzeyinde in-situ ve ex-situ sentezi yoluyla DNA dizileri, RNA transkriptleri ve proteinler aracılığıyla tespit edilir (Parsa vd., 2018). Dizi teknolojisi, hızlı, hassas, yüksek doğruluk ve verimlilik avantajlarına sahip bir teknolojidir (Jia vd., 2021). Gıda örneklerindeki patojenlerin tespiti amacıyla DNA tabanlı dizi (mikrodizi) ve alternatif dizi tabanlı teknolojiler kullanılmaya başlanmıştır.

DNA mikrodizisi, gen ekspresyon seviyesini ölçerek patojenlerin tespiti ve miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Wöhrle vd., 2020). DNA mikrodizisi, immobilize edilmiş nükleik asitlerin (oligonükleotidler, genomik DNA ve cDNA) katı yüzeylerdeki (yani naylon membranlar, cam slaytlar ve silikon çipler) nükleik asit problemlerine maruz bırakıldığı gelişmiş bir teknolojidir (Ranjbar vd., 2017). Polimeraz zincir reaksiyonundan daha iyi olan kolay, hızlı, uygun maliyetli ve güvenilir bir şekilde mikroorganizmaları doğrulamak ve karakterize etmek için kullanılabilen bir yöntemdir (Wang vd., 2017). Floresanlı nükleik asit problemleri test oligonükleotidleri ile çoğaltılır ve her çipin yüzlerce hedef nükleotidi tutabileceği hedef immobilize edilmiş tek zincirli nükleotidlere sahip yüzey çiplerine hibridize edilir (Wöhrle vd., 2020). Ancak bu yöntemi ilk kez kullananların teori ve pratikteki eksikliği ve sonuçların tekrarlanamaması bu yöntemin başlıca dezavantajlarıdır (Kabiraz et al., 2023).

1.2.5.3. Spektroskopi Tekniği

Bu yöntem, elektromanyetik radyasyon ve madde etkileşimi ile nitel ve nicel analiz için kullanılan analitik bir yöntemdir (Penner, 2017). Bu yöntem ile, gıdalarda hızlı patojen tespiti yapılabilmektedir. Mikrobiyal kontaminasyonu tanımlamak için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Raman spektroskopisi ve hiperspektral görüntüleme (Rahman vd., 2016) dahil olmak üzere çeşitli spektroskopik teknikler

kullanılmıştır. Bu yöntem molekül yüzeyine karşı oldukça hassastır. Ancak, zaman alıcı olması ve floresanla etkileşime girmesi, bu yöntemin başlıca dezavantajlarıdır.

FTIR spektroskopisi tekniği, gıda kaynaklı patojenlerin tespiti için hızlı ve makul derecede doğru bir biyokimyasal parmak izi tekniğidir ve çoklu istatistiksel yaklaşımlarla birlikte kullanılır (Cheng ve Sun, 2015). Bu teknik bakteri suşunun hızlı tespiti (Novais vd., 2019), et ürünlerinin kalite değerlendirmesi (Candoğan vd., 2021) ve deniz ürünlerinin mikrobiyolojik bozulmasının izlenmesi (Fengou vd., 2019) için uygundur. Yapılan çalışmalarda *B. cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus weihenstephanensis* FTIR spektroskopisi tekniği ile tespit edilebilmiştir (Bağcıoğlu vd., 2019).

Raman spektroskopisi tekniğinde ise hedef numunenin moleküler bileşimi belirli kriterlere göre aydınlatılabildiğinden gıda numunelerinden çeşitli analitlerin tespitinde oldukça uygundur (Pahlow vd., 2015). Raman spektroskopisi kullanılarak *S. aureus* ve *E. coli*'nin tespiti yapılabilmektedir (De Plano vd., 2019). Ayrıca, makine öğrenimi ile birleştirilen Raman spektroskopisinin kullanıldığı bir yaklaşım ile *Vibrio spp.*, *Shigella spp.* ve *Listeria spp.* gibi patojenik mikroorganizmalar hızlı bir şekilde ve artan doğruluk ile (% 87-95) tanımlanabilmektedir (Yan vd., 2021).

Hiperspektral görüntüleme tekniği (HSI), gıda kalitesini gerçek zamanlı olarak izlemek için ortaya çıkan teknolojilerden biridir. Bu teknik, analitleri tanımlamak için görüntüdeki her piksel için spektrumu elde etmeyi amaçlar (Gowen vd., 2015). Bu teknik, gıda işleme sırasında mikrobiyal kontaminasyonu veya gıda bozulmasını analiz ederek gıda kalitesinin hızlı ve kesin bir şekilde belirlenmesini sağlar (Kamruzzaman vd., 2015).

1.2.5.4. Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)

LAMP, gıda kaynaklı patojenleri tespitinde istenen gen üzerinde altı farklı bölgeyi tanımlamak için dört set primerin kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem Bst polimeraz, deoksiniükleotid trifosfatlar (dNTP'ler), betain, magnezyum sülfat ve bir tampon gerektirir (Gill ve Amree, 2020). Kısa bir süre içinde (neredeyse 1 saat) geleneksel PCR ürünlerinden yaklaşık 103 kat daha fazla olan önemli sayıda amplicon üretme kabiliyeti nedeniyle geleneksel PCR'den daha hızlı, hassas ve güvenilir bir patojen tespit tekniğidir (Law vd., 2015). *E. coli*, *Vibrio cholera* ve *Salmonella spp.* gibi gıda

kaynaklı patojenler LAMP tekniği kullanılarak tavuk ve et ürünlerinde 1 saat içinde tespit edilebilmektedir (Sayad vd., 2018).

1.2.5.5. Biyosensör

Biyosensör, biyolojik algılama elemanları tarafından belirli, ölçülebilir bir sinyal eldesi için bir analiti (hedef patojen) tespit etmek üzere tasarlanmış fiziksel bir dönüştürücünün kullanıldığı analitik bir cihazdır (Purohit vd., 2020; Zhang vd., 2020). Biyosensör aracılı tespit yöntemi, gıda kaynaklı patojenleri tespit etmek için kolay, düşük maliyetli, hızlı ve oldukça seçicidir. Buna karşılık, geleneksel yöntemler daha uzun zaman almakla birlikte emek yoğun, daha az seçici ve daha az özgüdür. Geleneksel yöntemler gıdadan canlı ancak kültürlenemeyen mikroorganizmaları tespit edemediğinden, geleneksel yöntemlere kıyasla gıda kaynaklı patojenleri tespit etmek için ideal bir tespit yöntemidir (Kumar vd., 2019). Hedef gıda kaynaklı patojeni tanıyan biyolojik algılama elemanlarına biyoreseptörler (antikorlar, enzimler, aptamerler, antimikrobiyal peptitler, bakteriyofaj, biyomimetik, hücre, doku ve nükleik asit probu gibi) denir. Bu reseptörler transdüserin yüzeyinde hareketsiz hale getirilerek seçici analit molekülleriyle etkileşime girerler (Shen vd., 2021). Biyosensör, analitleri algılamak için biyoreseptörlerin bağlandığı destekleyici bir matris üzerine dizayn edilir. En yaygın kullanılan sensör matrisleri ise, analite ve dönüştürücünün mekanizmasına göre seçilen kağıt, karbon macunu, grafit, camı karbon elektrot (GCE), indiyum kalay oksit (ITO) ve görüntü-grafi elektrotlardır (SPE). Bir biyosensörün kapasitesi, malzemenin doğasına, tasarımına ve sensör matrisi türüne bağlıdır (Purohit vd., 2020). Biyosensör yapısındaki dönüştürücü ise, tanıma elemanı sinyallerini ölçülebilir bir forma dönüştüren bir dedektör elemanıdır. Bir biyosensörde sinyal doğrudan veya dolaylı olarak ölçülerek hedef analitin varlığı ve miktarı tespit edilebilmektedir. Günümüze kadar hedef analitin belirlenmesinde elektrokimyasal, amperometrik, voltametrik, potansiyometrik, impedimetrik ve kolorimetrik biyosensörler olmak üzere birçok farklı biyosensör tasarlanmış ve farklı sektörlerde özellikle teşhis ve tanımlama alanında kullanılmışlardır (Kabiraz et al., 2023).

1.2.5.5.1. Altın nanoparçacıkların Kolorimetrik Tespit Yöntemlerindeki Rolü

AuNP'ler; ultra küçük boyutlu, stabil, biyolojik olarak uyumlu partiküller olup geniş yüzey alan kütle oranları ve yüksek yüzey reaktivitesi gibi eşsiz fizikokimyasal

özelliklere sahiptir. AuNP'ler, boyutlarına, şekillerine ve kümelenme durumlarına bağlı olarak farklı renkler göstererek kolayca işlevselleştirilebildikleri için kolorimetrik biyosensörlerin geliştirilmesi için mükemmel bir platform görevi görmektedir (Aldewachi vd., 2018). AuNP'lerin optik özellikleri yüzey plazmon rezonans (SPR) özelliklerine dayanmaktadır. SPR, altın elektronlarının, gelen radyasyona tepki olarak, ışığı hem absorbe etmesi hem de saçılmasını sağlayan rezonans sürecidir (Demirtaş ve Türk, 2021). AuNP'lerin bileşimlerini, şekillerini, boyutlarını veya agregasyon durumlarını çok küçük ölçüde değiştirerek belirgin bir SPR değişikliği ortaya çıkarılabilmektedir. Bu nedenle hastalık biyobelirteçlerinin, nükleik asitin, mikotoksinlerin ve mikroorganizmaların tespiti için çeşitli AuNP tabanlı kolorimetrik sensörlerin geliştirilmesi teşvik edilmektedir (Chen vd., 2018). AuNP'lerde agregasyon kaynaklı SPR değişiklikleri her zaman kırmızıdan maviye doğru belirgin şekilde renk değişimlerine neden olur ve çıplak gözle kolayca belirlenebilmektedir (Chen vd., 2018). Sonuç olarak AuNP'ler, agregasyon sırasında gözlemlenebilir renk değişimleri gösterebilen benzersiz boyut ve mesafeye bağlı yüzey plazmon rezonansı (SPR) özellikleri nedeniyle kolorimetrik analiz için prob olarak kullanılmaktadır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

2.1.1. Cihazlar

- Hassas Terazi (Sartorius CP224S)
- Saf su cihazı (Purelab Option R15)
- Mikropipet (Ependorf)
- Manyetik karıştırıcı (Corning PC-420, Amerika))
- pH metre (Hanna HI2002-02)
- Etüv (Microtest)
- UV-Vis spektrofotometre (Biochrom Libra S12)
- Buzdolabı (Beko, D1 8450 SM)
- Sonikatör (Sonorex Digital 10 P, BANDELIN)
- Zeta-Sizer (Malvern NS)
- FE-SEM (QUANTA 400 F Field Emission)
- Otoklav (Nüve OT 4060)
- UV-Solo TS Imaging System (Analytik Jena Company)

2.1.2. Kimyasallar

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Echerichia coli* (ATCC 25922)
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 19493)
- *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- Nutrient Broth (Merck)
- Nutrient Agar (Merck)
- Gliserol
- NaOH (Merck)
- Trisodyum sitrat dihidrat (S1804, Sigma-Aldrich)

- Altın (III) Klorür Trihidrat (520918, Sigma-Aldrich)
- Bromofenol Mavisi
- Etidyum bromür
- DNA ladder (100 bp, GENESTA™)
- NaCl (Merck)

2.2. Bakterilerin Kültüre Edilmesi ve DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada laboratuvar olanakları dahilinde belirlenen pozitif kontrol (*Staphylococcus aureus*) ve negatif kontrol (*Echerichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*) olarak seçilmiş olan tüm bakteri suşları Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarları'ndan temin edilerek nutrient broth ve sonrasında nutrient agar içerisinde, 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir. Bunun için gereken kültür ortamları ve hazırlanışları aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

Nutrient Broth İçeriği ve Hazırlanışı;

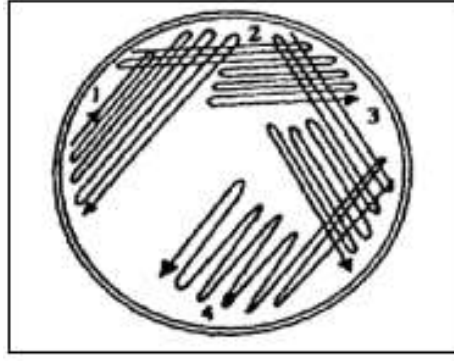
0.4 gr Nutrient Broth tartılarak 50 mL deiyonize su içerisinde çözdürüldü. Ardından bu karışım 3'er mL olarak 10 adet tüpe paylaştırılarak ağızları kapalı olarak otoklavlanmıştır.

Nutrient Agar İçeriği ve Hazırlanışı;

4 gr Nutrient agar tartılarak 200 mL deiyonize su içerisinde çözdürüldü. Ardından bu karışım erlende ağzı folyolanarak kapatılıp otoklavlanmıştır.

2.2.1. Bakterilerin kültüre edilmesi

10 adet petriye, otoklavlanan nutrient agardan (sıcakken) 20'şer mL olacak şekilde bunzen bekine yakın mesafeden konmuştur ve agarların donması için 2 saat beklenmiştir. Agar donunca ateş başında T çizgi ekim yöntemi (Şekil 2.1.) ile sıvı kültürden katı agar ortamına ekim yapılmıştır. Ardından petriler parafilmlele ters bir şekilde etüve alınıp 2 gün kültüre edilmiştir (37°C' de). 2 günün ardından bu katı kültürlerden özenin ucu ile alınarak sıvı kültüre ekim yapılmıştır. Sıvı kültürler 100 rpm karıştırma hızında, 37°C' de su banyosunda 1 gün daha kültüre edilmiş ve kültürasyonun ardından sıvı kültürlerin optik yoğunlukları (OD) 600 nm'de okutulmuştur.



Şekil 2.1. T çizgi ekim yöntemi ile bakteri ekimi

2.2.2. Bakteriyel Kültürlerden DNA İzolasyonu

DNA'lar kaynatma yöntemi (Shehata ve Hershan, 2016) ve ayrıca DNA ekstraksiyon kiti (kullanım talimatına uygun bir şekilde) ile bakteriyel kültürlerden ekstrakte edilmiş ve DNA'ların saflıkları spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) ile değerlendirildikten sonra PCR ile çoğaltım aşamasına geçilmiştir. Kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu yönteminde kısaca bakteriyel süspansiyonlar 13000 rpm'de santrifüj edilmiş (10 dk), bakteriyel pellet 200 µL steril su ile (DNaz ve RNaz içermeyen) resüspanse edilip vortekslenmiş ve ardından 100°C'de 10 dk kaynatılarak oda sıcaklığına gelmesi için bir süre bekletilmiştir. Son aşamada ise tekrar vortekslenen süspansiyon 13000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant 1.5 mL'lik bir steril eppendorfa alınarak ileri denemeler için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.3. Gen Bölgesi Çoğaltımı İçin Primerlerin Belirlenmesi

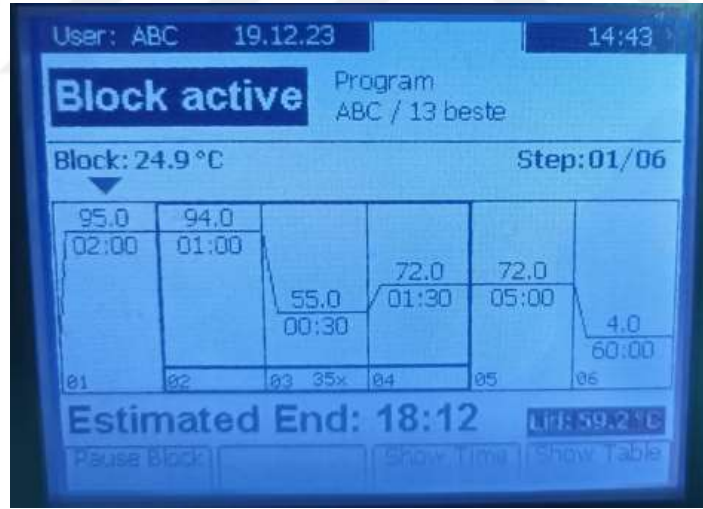
PCR reaksiyonunda çoğaltılmak üzere belirlenen suşun diğer bakterilerden farkının ortaya konabilmesi amacıyla belirlenen hedef gene (nuc geni) özgü primerler belirlenmiştir (kuyruklu ve kuyuksuz primer setleri) (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Hedef gen bölgesi çoğaltımında kullanılan primer setleri (Cheng vd., 2023; Tortajada-Genaro, 2022)

PCR Türü	Primer Adı	Primer Sekansı (5'-3')
PCR	Forward Primer	5'CAAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGGT
	Reverse Primer	5'TAATTTAACCGTATCACCATCAATCGCTTTA
Kuyruklu-PCR	Kuyruklu-Forward Primer	5'ATGTA CTCTGTCCGATT[spC3]CAAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGGT
	Reverse Primer	5'TAATTTAACCGTATCACCATCAATCGCTTTA

2.4. Kuyruksuz ve Kuyruklu Primer Setleri ile Gen Bölgesi Çoğaltımı

Çalışma kapsamında hedeflenen gen bölgesinin çoğaltımı için kuyruksuz veya kuyruklu primer setleri kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon koşulları Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Hedef gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı

2.5. Modifiye Olmayan Altın Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

AuNP'ler literatürde yaygın olarak kullanılan yönteme göre (Turkevich yöntemi) sentezlenmiştir (González-Domínguez vd., 2018). Buna göre kısaca, kaynayan bir altın (III) klorür trihidrat (250 mL, 0.5 mM) çözeltisine trisodyum sitrat dihidrat

çözeltisi (12.5 mL, 38.8 mM) ilave edilmiştir. Ardından nihai karışım, şarap kırmızısı bir renk elde edilene kadar 15 dakika karıştırılacak ve oda sıcaklığında düşük karıştırma ile soğutulmuştur. Sonuçta hazırlanan AuNP'ler, taramalı elektron mikroskobu (Bu analiz, Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan QUANTA 450 FEG (FEI, Oregon, Amerika Birleşik Devletleri) marka SEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analizden önce, kurutularak toz haline getirilen AuNPs'ler yaklaşık 10 nm kalınlığında Au/Pd ile kaplanmıştır. AuNPs'lerin farklı büyütme oranlarında SEM görüntüleri alınmıştır.) ve UV-Görünür spektroskopi (çözeltilerin 400-700 nm dalga boyu arasındaki absorbanı UV-Vis spektrometresi (Biochrom Libra S12) kullanılarak elde edilmiştir) ve ayrıca DLS yöntemi (altın nanoparçacık çözeltisinin 1 mL su ile seyreltilmesinden sonra 25°C'de bir parçacık analizörü (Zetasizer Nano, Malvern Instrument Co., İngiltere) kullanılarak) ile karakterize edilmiştir.

2.6. Bakteriyel DNA'ların Agaroz Jel ile Görüntülenmesi

PCR ile çoğaltılan bakteriyel DNA'ların hedef geni taşıyıp taşımadığı kolorimetrik yöntem öncesinde jel elektroforez yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için; 0.45 gr agaroz tartılarak 30 mL TAE tamponu içerisinde çözdürülmüş ve içerisine 3 µL EtBr ilave edilmiş ve tanka aktarılarak oda sıcaklığında katılaşıncaya kadar bekletilmiştir. Ardından 10'ar µL PCR ürünü 1'er µL bromofenol mavisini ile karıştırılarak kuyulara yüklenmiştir. Referans DNA dizisi olarak ise 5 µL DNA ladder (100 bp/GENESTA™) kullanılmıştır. Kuyulara yükleme işleminin tamamlanmasının ardından TAE tamponu içerisinde 90 V akım ile jel elektroforez işlemi ve son aşamada ise UV ışığı altında (UVSolo TS Imaging System/Analytik Jena Company) DNA dizilerine ait bantların görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.7. Bakteriyel DNA'ların Kolorimetrik Belirlenmesi

PCR ile elde edilen saf çoğaltım ürünleri (1 µL) AuNP içeren (1:10 dilüsyon) belirleme solüsyonu ortamında (sitrat tamponu içeren (100 mM, pH 6.75), nanoparçacıklar ile etkileştirilmiştir. Ardından ortama NaCl çözeltisi (100 mM, 4µL) ilave edilerek nanoparçacıkların çökelmeye eğilimi meydana gelen renk değişikliği ile belirlenmiştir. Bu belirlemenin ardından, elde edilen görüntüler (tuz çözeltisinin ilavesinden 10

dakika sonra) kaydedilmiş ve bu görüntüler, akıllı telefon uygulaması (Color Detector RGB) kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.8. İstatistiksel Analiz

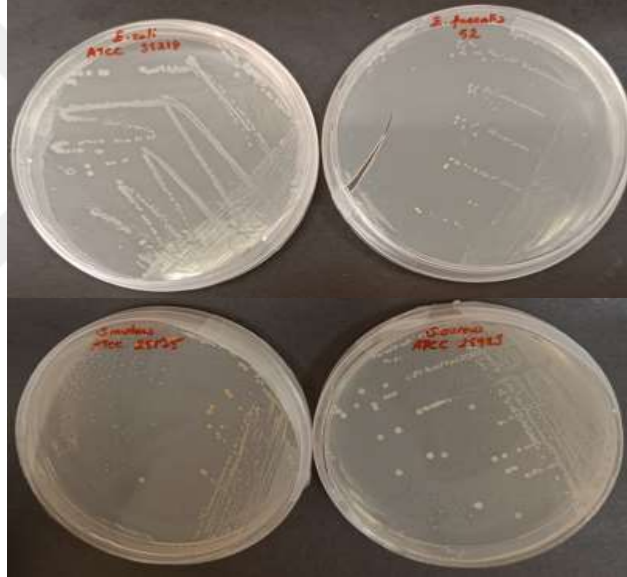
Akıllı telefon uygulaması kullanılarak elde edilen RGB değerlerinin istatistiki analizi student t-test ile gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama değerler olarak sunulmuştur. İstatistiki anlamlılık p değerinin 0.01'den ve 0.001'den küçük olması ile belirtilmiştir.



3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Bakteri Kültürü ve DNA Ekstraksiyonu

Çalışma kapsamında seçilmiş olan bakteriler kültüre edilmiş (Şekil 3.1.) ve ardından genomik DNA'ları ekstre edilmiştir. Kültüre edilen bakterilerin bulunduğu petrielerde kültürasyon sırasında herhangi bir kontaminasyona rastlanmamış, her bir bakteri türü için tek düşen kolonilerden sıvı kültüre ekim steril koşullarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Kültüre edilen bakteriler

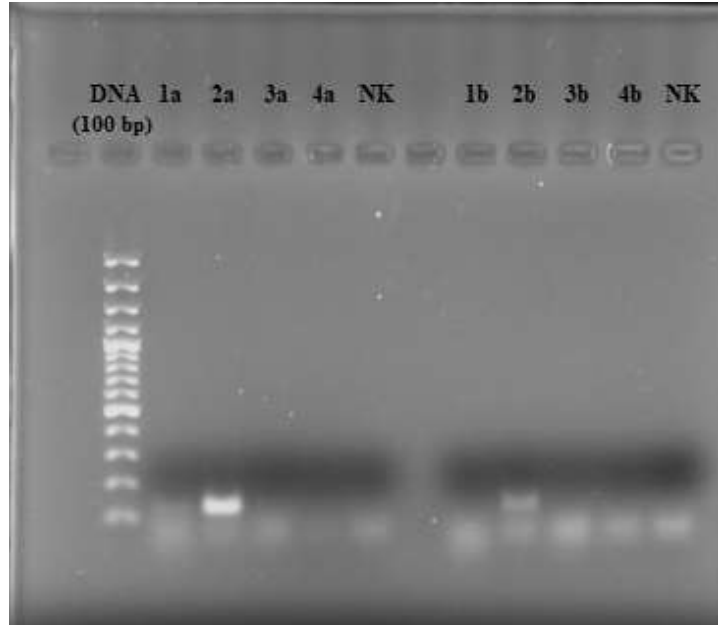
Sıvı kültürlerin DNA ekstraksiyonu öncesinde optik yoğunlukları da 600 nm'de yapılan absorbans okuma yoluyla değerlendirilmiştir (Çizelge 3.1.). Buna göre okunan değerlerin 1 civarında olması sonucunda bakteri sayılarının DNA ekstraksiyonu için yeterli yoğunluğa ulaştığı sonucuna varılarak DNA ekstraksiyonu aşaması gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. Sıvı kültürlerin OD (600 nm)'de okunan absorbans değerleri

Bakteri türü	OD (600 nm)
<i>S. mutans</i>	1,063
<i>S. aureus</i>	1,460
<i>E. coli</i>	1,508
<i>E. feacelis</i>	0,642

3.2. Kuyruksuz ve Kuyruklu Primer Setleri ile Gen Bölgesi Çoğaltımı

Hedef gen bölgesi kuyruksuz ve kuyruklu primer setleri ile ayrı ayrı olacak şekilde aynı program kullanılarak çoğaltılmış ve ardından çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde tespiti gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.). Buna göre hedef bölgeyi (nuc geni) içeren *S.aureus* suşu için yapılan gerek kuyruksuz gerek kuyruklu primer setleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda gerçekleştirilen çoğaltımda hedef gen bölgesini gösteren bantlar jel üzerinde net bir şekilde görüntülenebilmiştir. Negatif kontrol grupları olarak seçilen diğer suşlara ait genomik DNA'larda ise beklenildiği üzere jel üzerinde bant tespit edilememiştir.



Şekil 3.2. Kuyruksuz (1a-4a) ve Kuyruklu (1b-4b) primer setleri ile çoğaltılan hedef gen bölgesinin jel agaroz görüntüsü (DNA ladder-100 bp)

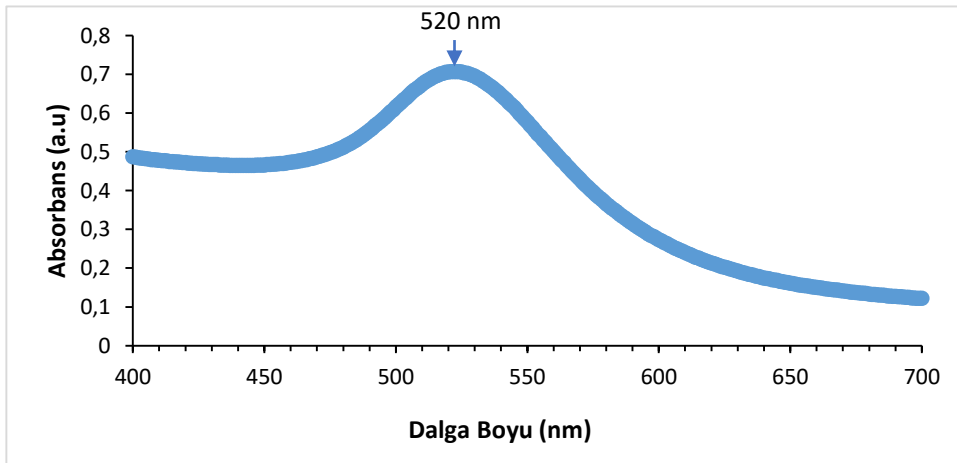
1a-*S. mutans*, 2a-*S. aureus*, 3a-*E. coli*, 4a-*E. feacelis*, NK. Negatif Kontrol, 1b-*S. mutans*, 2b-*S. aureus*, 3b-*E. coli*, 4b- *E. feacelis*, NK. Negatif Kontrol)

3.3. Modifiye Olmayan Altın Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

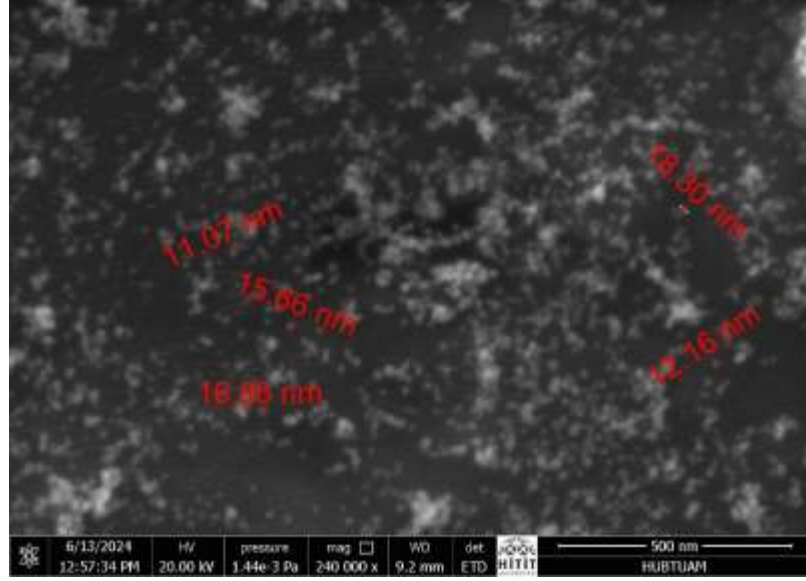
PCR ürünleri ile kolorimetrik etkileşim temelinde gerçekleştirilecek hedef bölge tespiti amacıyla sentezlenen Altın nanoparçacıklara ait karakterizasyon çalışma sonuçları Şekil 3.3., 3.4. ve 3.5’de, ayrıca Çizelge 3.2.’de belirtilmiştir. Buna göre altın nanoparçacık süspansiyonu karakteristik şarap renginde homojen bir görünümde (Şekil 3.3.). Literatür araştırmasına göre AuNP çözeltisinin karakteristik pikinin 520-540 nm arasında olduğu bilinmektedir (Aktürk vd., 2018). Başarılı AuNP oluşumu, UV-Vis spektral taramasında yaklaşık 520 nm dalga boyunda ortaya çıkan yüzey plazmon rezonansı (SPR) piki ile açıkça gösterilmiştir (Şekil 3.4.). Sentezlenen parçacıklara ait SEM görüntüsünde ise parçacıkların topaklaşma eğiliminde olmadığı ve yuvarlağa yakın bir şekillerinin olduğu görülmüştür (Şekil 3.5.).



Şekil 3.3. Sentezlenen AuNP’lerin tüp içerisindeki görünüşü



Şekil 3.4. Sentezlenen AuNP’lerin UV-Vis spektrumu



Şekil 3.5. Sentezlenen AuNP'lerin SEM Görüntüsü

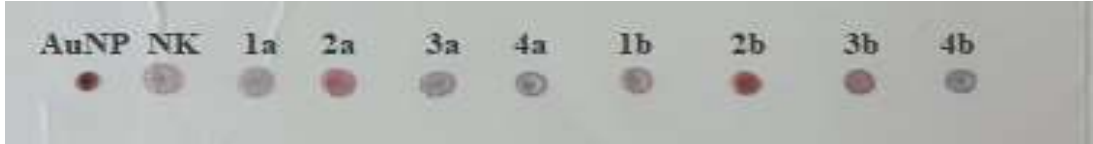
AuNP'lerin zeta potansiyeli ve ortalama boyutu sırasıyla -26,4 mV ve 27,7 nm olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2.). Literatüre göre, zeta potansiyeli -10 ila +10 mV arasında olan NP'ler yaklaşık olarak nötr olarak kabul edilirken, zeta potansiyeli +30 mV'den büyük veya -30 mV'den düşük olan NP'ler sırasıyla güçlü katyonik ve güçlü anyonik olarak kabul edilir ve yük ne kadar güçlü olursa, parçacıkların kolloidal stabilitesi o kadar iyi ve dolayısıyla raf ömrü de o kadar uzun olmaktadır (Clogston ve Patri, 2011). Bu bilgiye dayanarak sentezlenen NPs'lerin sahip oldukları -26,4 mV zeta potansiyel değeri ile agregasyona karşı yeterince yüksek itme kuvvetine sahip olduklarından dolayı stabil oldukları düşünülmektedir. AuNP'lerin ortalama boyutu 27,7 nm ve PDI (çoklu dağılım indeksi) değeri 0,5 olarak bulunmuştur. PDI değeri temel olarak belirli bir örnek içindeki popülasyon büyüklüğü dağılımının bir temsilidir. PDI'nın sayısal değeri 0,0 (parçacık boyutuna göre tek tip numune için) ile 1,0 (çoklu parçacık boyutuna sahip numune için) arasında değişir. Çalışma kapsamında sentezlemiş olduğumuz NPs'lere ait PDI değerinin ise literatüre göre kabul edilen sınır değerinin (0,7) de altında olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.2. Sentezlenen AuNP'lerin hidrodinamik boyutu (nm), boyut dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel (mV) değerleri

ÖRNEK ADI	Ort.boyut (nm ± std. sapma)	PDI	Zeta Pot. (mV ± std. sapma)
AuNP	27,7±0,8	0,5±0,0	-26,4±1,3

3.4. Bakteriyel DNA'ların Kolorimetrik Belirlenmesi

PCR ile elde edilen saf çoğaltım ürünleri AuNP içeren belirleme solüsyonu ortamında nanoparçacıklar ile etkileştirilmiş, ardından ortama NaCl çözeltisi ilave edilerek nanoparçacıkların çökmeye eğilimi meydana gelen renk değişikliği ile belirlenmiş (Şekil 3.6.) ve bu belirlemenin ardından renk yoğunlukları akıllı telefon uygulaması (Color Detector RGB) kullanılarak kaydedilmiştir (Çizelge 3.3.).



Şekil 3.6. Kuyruksuz (1a-4a) ve Kuyruklu (1b-4b) primer setleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin AuNP ile plastik membran üzerinde etkileşimi (AuNP-Altın nanoparçacık, NK-Negatif Kontrol, 1a-*S. Mutans*, 2a-*S. aureus*, 3a-*E. Coli*, 4a. *E. feacelis.*, 1b-*S. Mutans*, 2b-*S. aureus*, 3b-*E. Coli*, 4b- *E. feacelis*)

Hedef gen bölgesinin gerek kuyruksuz ve gerek kuyruklu primer setleri kullanılarak çoğaltılabildiği 2 numaralı örneklere ait (sırasıyla 2a ve 2b) RGB değerlerinin direkt AuNP çözeltisinin sahip olduğu RGB değerlerine diğer örneklere göre daha yakın olduğu görülmektedir. Beklenildiği gibi özellikle 2b örneğinin sahip olduğu R (107,5), G (53,1), B (56,4) değerlerinin AuNP'nin sahip olduğu R (85,9), G (38,8), B (047.0) değerlerine en yakın olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni de 2b örneğindeki kuyruklu primer ile çoğaltılmış hedef asimetrik DNA dizilerinin AuNP'ler ile elektrostatik etkileşimleri nedeniyle NaCl'ün ortama ilavesinin ardından AuNP agregatlarının oluşmaması ve AuNP'lerin koloidal fazda kalmasıdır. Benzer yöntem uygulanarak yapılan başka bir çalışmada da yine çalışma sonuçlarımıza benzer sonuçlar elde edilmiştir (Tortajada-Genaro vd., 2022). Yapılan istatistiksel analize göre 2b örneğine ait değerlerin AuNP grubu değerlerine diğer tüm gruplardan ($p < 0,001$) daha yakın olması sebebiyle istatistiksel olarak anlamlılığında azalma ($p < 0,01$) olmuştur. Bu analiz sonucu da yine 2b örneğindeki AuNP'lerin diğer tüm gruptakilere göre daha stabil kalarak koloidal fazın korunduğunun ispatıdır.

Çizelge 3.3. Membran üzerindeki örneklere ait akıllı telefon uygulaması ile elde edilen renk yoğunluk değerleri

	AuNP	NK	1a	2a	3a	4a	1b	2b	3b	4b
R (red)	85,9	141,9**	134,9**	137,8**	119,1**	103,6**	128,3**	107,5*	120,3**	103,8**
G (green)	38,8	132,2**	129,9**	094,5**	114,1**	104,5**	119,3**	53,1*	101,6**	106,8**
B (blue)	47,0	139,8**	135,3**	103,6**	120,1**	109,6**	124,3**	56,4*	110,2**	112,9**

NOT: *: $p < 0,01$ AuNP grubuna göre istatistiki olarak anlamlılık, **: $p < 0,001$ AuNP grubuna göre istatistiki olarak anlamlılık

Bu tez çalışmasında hedef gıda kaynaklı patojene ait asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu (asPCR) ile elde edilen amplifikasyon ürünü altın nanoparçacık temelli kolorimetrik bir yöntemle tespit edilmiştir. Bu yöntem geliştirilerek ileri bir aşamaya taşınabilir. Literatürde bu çalışmaya benzer amplifikasyon ürünleriyle AuNP temelli gıda kaynaklı patojen tespit yöntemleri üzerine çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu tez çalışmasına benzer olarak; Fan Li ve arkadaşları *Bacillus cereus*'un tespiti için asPCR ve propidyum monoazid (PMA) işlemiyle birleştirilmiş AuNP tabanlı kolorimetrik analiz yöntemi geliştirmiş ve bu yöntemi 8 bakteri suşu üzerinde denemişlerdir (Li vd., 2018). Çalışmalarında amplifikasyon ürünlerinin AuNP'ler ile etkileşimi sonucu hedef patojen grubunda agregasyon olmadığını ve diğer suşlar (hedef patojen haricindeki) için agregasyon sonucu renk değişimleri meydana geldiğini gözlemlemiş ve bunu da kolorimetrik olarak belirlemişlerdir. Tortajada-Genaro ve arkadaşları da, gıda kalitesini izlemek için glutenli ve glutensiz gıdaların tespitinde tahıla özgü bir geni (trnL geni) tespit etmek üzere bir RPA-AuNP testi tasarlayarak kolorimetrik AuNP aracılı bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri algılama yöntemlerini gıda karışımlarına ait amplifikasyon ürünlerini tespit etmek için uygulamışlar. Yine bu tez çalışmasında kullanılan yöntemle benzer şekilde akıllı telefon yardımıyla amplifikasyon ürünlerinin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak sonuçları kolorimetrik olarak gözlemlemişler ve farklı RGB profilleri elde etmişlerdir (Tortajada-Genaro vd., 2022). Wang ve arkadaşları AuNP tabanlı multipleks oligonükleotid ligasyon-PCR ve evrensel oligonükleotid mikrodizi teknolojisini birleştiren yeni bir çalışma gerçekleştirmiş, bu çalışmada *Shigella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* ve *Vibrio*

parahaemolyticus dahil olmak üzere sekiz yaygın gıda kaynaklı patojeni tespit etmeye çalışmışlar ve sonuçta yedi önemli domuz virüsünü eş zamanlı olarak tespit edebilmişlerdir (Wang vd., 2013).

Li ve arkadaşları ise tek ve çift sarmallı oligonükleotidlerin kolloidal çözeltideki altın nanopartiküllerine adsorpsiyonda farklı eğilimlere sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Bu tespitlerini ise, altın agregasyonu ile ilişkili renk değişimlerine dayalı bir hibridizasyon testi tasarlamak için kullanmışlardır. Altta yatan adsorpsiyon mekanizması elektrostatik olduğundan, altının, probun veya hedef DNA'nın kovalent fonksiyonelleştirilmesine gerek olmadığını ortaya koymuşlar (Li ve Ruthberg, 2004) ki benzer şekilde bu tez çalışmasında da adsorpsiyon mekanizması elektrostatik etkileşime dayalı olduğundan parçacıkların veya hedef DNA'nın işlevselleştirilmesine gerek duyulmamıştır. Sonuç olarak bu tez çalışmasında hedef gıda kaynaklı patojene ait asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edilen amplifikasyon ürününün altın nanoparçacıklarla agregasyon tabanlı kolorimetrik olarak hızlı teşhisi gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇ

S. aureus gıda güvenliği sorunlarından olan önemli bir patojenik bakteridir, aynı zamanda büyükbaş hayvanlar ve koyunlarda mastitise neden olan birincil patojenik bakteridir. İnsan ve hayvan sağlığını tehlikeye atar ve büyük ekonomik kayıplara yol açar. Bu nedenle, *S. aureus*'un tespiti ve önlenmesi özellikle önemlidir. Tespit kapasitesinin iyileştirilmesi, gıda güvenliği sorunlarının doğru ve zamanında tanımlanmasını kolaylaştırır ve bu da fiziksel ve ekonomik kayıpları önler. Ancak, tespit yöntemlerinin duyarlılığı, özgüllüğü ve zamanlaması, test edilecek örneklerin işlem aşamalarından büyük ölçüde etkilenir.

Gıda kaynaklı hastalıkları önleyebilmek ve hastalık risklerini en aza indirmek için mikroorganizmaların tespiti önem arz etmektedir. Gelişmiş tespit yöntemlerinin avantajları arasında daha hızlı yanıt, basitlik, güçlü yoğunluk, düşük maliyet ve hızlı veri analizi yer alır. Bununla birlikte, hem geleneksel hem de gelişmiş tekniklerin avantajları ve dezavantajları vardır; bu nedenle, yöntem seçimi sırasında benimsenen yöntem belirli bir gıda kaynaklı patojen için doğru, güvenilir, uygun maliyetli, seçici olmalı ve tutarlı sonuçlar elde etmek için yeterince hızlı olmalıdır. Bu amaçla birçok tespit yöntemi geliştirilmiştir. PCR, kültür ve immünolojik yöntemler bu alanda en sık kullanılan yöntemlerdir. Teknolojik imkanlar çoğaldıkça sürekli daha hızlı, pratik, ekonomik ve *in vitro* yöntemler geliştirilmek istenmiştir. Gıda kaynaklı patojen tespiti için kolorimerik sensörler kullanılması yöntemi de bu çabaların güncel sonuçlarından birisidir. Birçok kolorimetrik yöntemde, AuNP'lerin agregasyonundan yararlanılarak hedef nükleik asitler veya diğer analitler seçici olarak tanınmıştır.

Hem kuyuksuz hem de kuyuklu primer setleri kullanılarak yapılan PCR'dan elde edilen çoğaltım ürünlerindeki hedef gen bölgesinin varlığı standart yöntem olarak agaroz jel elektroforezi uygulanarak, pozitif kontrol olarak seçilen *S. aureus* için belirlenebilmiştir. Negatif kontrol olarak seçilen diğer bakteri türlerinde ise bu gen bölgesinin varlığı tespit edilememiştir. Çalışma kapsamında PCR çoğaltım ürünleri ile etkileşime girecek olan AuNP'ler yaygın olarak kullanılan yöntem olan Turkevich yöntemi ile etkili bir şekilde sentezlenebilmiş ve karakterize edilmiştir. Çalışmanın son

aşamasında ise agaroz jele alternatif olarak PCR çoğaltım ürünü-kolloidal AuNP'lerin kolorimetrik temelli etkileşimi aracılığıyla çoğaltım ürünlerindeki hedef gen bölgesi saptanmaya çalışılmıştır. Bunun için etkileşim üzerine belirlenen miktarda NaCl ilavesi gerçekleştirilmiş ve renk değişimi gözlemlenmiştir. Hedef gen bölgesinin (nuc geni) PCR ile çoğaltılması sonucunda özellikle *S. aureus* için NaCl ilavesi sonrasında altın nanoparçacıkları etkileşim nedeniyle kolloidal fazda kalarak renk kırmızı kalmıştır. Diğer örnek gruplarında ise altın nanoparçacıkları agregasyona uğradığından renk mavi-mor olarak görünmüştür. Bu renk yoğunluklarının da yine akıllı telefon uygulaması ile sayısal değerler olarak karşılıkları belirlenebilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında hedef gıda kaynaklı patojene ait asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edilen amplifikasyon ürününün altın nanoparçacıklarla elektrostatik etkiye dayalı agregasyon tabanlı kolorimetrik olarak hızlı teşhisi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında patojen hedef dizisinin günümüzde yaygın kullanılan diğer yöntemlere göre daha hızlı ve ekonomik bir şekilde tespiti gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın avantajları ve dezavantajları gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde ileri tekniklerin geliştirilmesi ve daha kapsamlı tespit yöntemlerinin ortaya konmasında yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

Aktürk, Ö., Gök, Z. G., Daş, T. M., & Erdemli, Ö. (2018). Serisin kaplı altın nanoparçacık sentezlenmesi ve karakterizasyonu. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 33(2), 675-684.

Aldewachi, H., Chalati, T., Woodroffe, M. N., Bricklebank, N., Sharrack, B., & Gardiner, P. (2018). Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale*, 10(1), 18-33.

Amani, J., Mirhosseini, S. A., & Fooladi, A. A. I. (2015). A review approaches to identify enteric bacterial pathogens. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2).

Andersson A., Rönner U., Granum P.E. (1995) What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int J Food Microbiol* 28: 145–155

Authority, E. F. S., Prevention, E. C. f. D., & Control. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), e04634.

Bacon, R. T., & Sofos, J. N. (2003). Characteristics of biological hazards in foods. *Food safety handbook*, 10, 157-195.

Bağcıoğlu, M., Fricker, M., Johler, S., & Ehling-Schulz, M. (2019). Detection and identification of *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus weihenstephanensis* via machine learning based FTIR spectroscopy. *Frontiers in microbiology*, 10, 902.

Belshaw, R., Gardner, A., Rambaut, A., & Pybus, O. G. (2008). Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends in ecology & evolution*, 23(4), 188-193.

Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M., Musci, M., Concina, I., ... & Sberveglieri, G. (2009). Differentiation of the volatile profile of microbiologically contaminated canned tomatoes by dynamic headspace extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Talanta*, 77(3), 962-970.

Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS microbiology*, 29;3(3):529-563, 529.

Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of clinical microbiology*, 30(7), 1654-1660.

Candoğan, K., Altuntas, E. G., & İğci, N. (2021). Authentication and quality assessment of meat products by fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Food Engineering Reviews*, 13(1), 66-91.

Cao, X., Li, P., Feng, X., Liu, D., Wang, X., & Wang, L. (2024). Detection of 13 foodborne pathogens in aquatic products using visual chromogenic chips based on asymmetric multiplex polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Food Control*, 155, 110100.

CDC, (2012). What is a foodborne disease outbreak and why do they occur. Available from: <http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html#whatisanoutbreak>.

Cemek, K., Ünal, B., Zenger, O., & Peşint, G. B. (2021). Gıda güvenliği ve sağlık alanında patojen mikroorganizmaların tespitine yönelik SPR biyosensör uygulamaları. *Artıbilim: Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4(2), 50-63.

Chang, C. C., Chen, C. P., Wu, T. H., Yang, C. H., Lin, C. W., & Chen, C. Y. (2019). Gold nanoparticle-based colorimetric strategies for chemical and biological sensing applications. *Nanomaterials*, 9(6): 861.

Chen, X., Liang, Y., Zhang, W., Leng, Y., & Xiong, Y. (2018). A colorimetric immunoassay based on glucose oxidase-induced AuNP aggregation for the detection of fumonisin B1. *Talanta*, 186, 29-35.

Cheng, J. H., & Sun, D. W. (2015). Recent applications of spectroscopic and hyperspectral imaging techniques with chemometric analysis for rapid inspection of microbial spoilage in muscle foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 478-490.

Cheng, R., Li, L., Zhen, S., Liu, H., Wu, Z., Wang, Y., & Wang, Z. (2023). Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in milk and pork via immunomagnetic separation and recombinase polymerase amplification. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e02249-22.

Cho, I. H., Bhunia, A., & Irudayaraj, J. (2015). Rapid pathogen detection by lateral-flow immunochromatographic assay with gold nanoparticle-assisted enzyme signal amplification. *International journal of food microbiology*, 206, 60-66.

Clogston, J.D., Patri, A.K. (2011). Zeta Potential Measurement. In: McNeil, S. (eds) *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. *Methods in Molecular Biology*, vol 697. Humana Press.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822-880.

De Medici, D., Kuchta, T., Knutsson, R., Angelov, A., Auricchio, B., Barbanera, M., ... & Wagner, M. (2015). Rapid methods for quality assurance of foods: the next decade with polymerase chain reaction (PCR)-based food monitoring. *Food analytical methods*, 8, 255-271.

Demirtaş, H., Türk, C. Ş. (2021). Altın Nanopartiküller ve Kanserde Kullanımları. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 45(1), 70-95.

De Plano, L. M., Fazio, E., Rizzo, M. G., Franco, D., Carnazza, S., Trusso, S., ... & Guglielmino, S. P. (2019). Phage-based assay for rapid detection of bacterial pathogens in blood by Raman spectroscopy. *Journal of immunological methods*, 465, 45-52.

FDA, (2012). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Second Edition.. Available from:

Fengou, L. C., Lianou, A., Tsakanikas, P., Gkana, E. N., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2019). Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy and multispectral imaging as means of estimating the microbiological spoilage of farmed sea bream. *Food microbiology*, 79, 27-34.

Filipiak, W., Sponring, A., Baur, M. M., Filipiak, A., Ager, C., Wiesenhofer, H., ... & Amann, A. (2012). Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC microbiology*, 12, 1-16.

García, A., Fox, J. G., & Besser, T. E. (2010). Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a one health perspective. *Ilar Journal*, 51(3), 221-232.

Gill, P., & Amree, A. H. (2020). AS-LAMP: a new and alternative method for genotyping. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 12(1), 2.

González-Domínguez, J. M., León, V., Lucío, M. I., Prato, M., & Vázquez, E. (2018). Production of ready-to-use few-layer graphene in aqueous suspensions. *Nature protocols*, 13(3), 495-506.

Gowen, A. A., Feng, Y., Gaston, E., & Valdramidis, V. (2015). Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, 137, 43-54.

Hayashi, K., & Yandell, D. W. (1993). How sensitive is PCR-SSCP? *Human Mutation*, 2(5), 338-346. doi:10.1002/humu.1380020507

<https://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/>.

Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International journal of food microbiology*, 117(3), 237-257.

ICMSF(International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (1996). *Micro-organisms in Foods 5, Characteristics of Microbial Pathogens*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; [[Google Scholar](#)].

IFT (2004) Bacteria associated with foodborne diseases. *Institute of food technologists—Scientific Status Summary*. Aug;2004:1–25.

Ishioka, T., Yoshizumi, M., Izumi, S., Suzuki, K., Suzuki, H., Kozawa, K., ... & Kimura, H. (2005). Detection and sequence analysis of DNA polymerase and major envelope protein genes in koi herpesviruses derived from *Cyprinus carpio* in Gunma prefecture, Japan. *Veterinary microbiology*, 110(1-2), 27-33.

Jia, X. X., et al. (2022). The role of suspension array technology in rapid detection of foodborne pollutants: applications and future challenges, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1–14.

Kabiraz, M. P., Majumdar, P. R., Mahmud, M. C., Bhowmik, S., & Ali, A. (2023). Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: A comprehensive review. *Heliyon*, 9(4).

Kamruzzaman, M., Makino, Y., & Oshita, S. (2015). Non-invasive analytical technology for the detection of contamination, adulteration, and authenticity of meat, poultry, and fish: A review. *Analytica chimica acta*, 853, 19-29.

Karimzadeh, R., & Ghassab, R. K. (2022). Identification of nuc nuclease and sea enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from nasal mucosa of burn hospital staff: a cross-sectional study. *New Microbes and New Infections*, 47, 100992.

Kim, S. O., & Kim, S. S. (2021). Bacterial pathogen detection by conventional culture-based and recent alternative (polymerase chain reaction, isothermal amplification, enzyme linked immunosorbent assay, bacteriophage amplification, and gold nanoparticle aggregation) methods in food samples: A review. *Journal of Food Safety*, 41(1), e12870.

Kumar, A., Malinee, M., Dhiman, A., Kumar, A., & Sharma, T. K. (2019). Aptamer technology for the detection of foodborne pathogens and toxins. In *Advanced biosensors for health care applications* (pp. 45-69). Elsevier.

Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 208-236.

Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5, 770.

Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5, 770.

Law, J. W.-F., et al. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages, and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 770.

Lazcka, O., Del Campo, F. J., & Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7), 1205-1217.

Li, F., Li, F., Yang, G., Aguilar, Z. P., Lai, W., & Xu, H. (2018). Asymmetric polymerase chain assay combined with propidium monoazide treatment and unmodified gold nanoparticles for colorimetric detection of viable emetic *Bacillus cereus* in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 1455-1461.

Li, H., Rothberg, L. (2004). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39), 14036-14039.

Li, S., Zhang, Y., Tian, J., & Xu, W. (2020). Luminescent DNAzyme and universal blocking linker Super Polymerase Chain Reaction visual biosensor for the detection of Salmonella. *Food chemistry*, 324, 126859.

Manzano, M., Viezzi, S., Mazerat, S., Marks, R. S., & Vidic, J. (2018). Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor for detecting hepatitis A virus. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 89-95.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., & Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607.

Mitscherlich, E., & Marth, E. H. (1984). *Microbial Survival in the Environment: Bacteria and Rickettsiae Important in Human and Animal Health*. Berlin: Springer-Verlag; 1984.

Mossel D.A.A., Corry J.E., Struijk C.B., et al. (1995) *A textbook for advanced studies*. Chichester: John Wiley and Sons. Essentials of the microbiology of foods; pp. 146–150.

Nair, P. S., & Surendran, P. K. (2005). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn.

NCBI (2017). National Centre for Biotechnology Information.. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>.

Novais, Â., Freitas, A. R., Rodrigues, C., & Peixe, L. (2019). Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, 427-448.

P.S. Nair, P.K. Surendran, *Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fish and Prawn*, 2005.

Pahlow, S., Meisel, S., Cialla-May, D., Weber, K., Rösch, P., & Popp, J. (2015). Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Advanced drug delivery reviews*, 89, 105-120.

Parsa, S. F., Vafajoo, A., Rostami, A., Salarian, R., Rabiee, M., Rabiee, N., ... & Hamblin, M. R. (2018). Early diagnosis of disease using microbead array technology: a review. *Analytica chimica acta*, 1032, 1-17.

Penner, M. H. (2017). Basic principles of spectroscopy. *Food analysis*, 79-88.

Purohit, B., Vernekar, P. R., Shetti, N. P., & Chandra, P. (2020). Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. *Sensors International*, 1, 100040.

Qi, X., Wang, Z., Lu, R., Liu, J., Li, Y., & Chen, Y. (2021). One-step and DNA amplification-free detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples: Combining magnetic relaxation switching and DNA hybridization reaction. *Food chemistry*, 338, 127837.

Quainoo, S., et al. (2017). Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(4), 1015-1063.

Rajkowski K.T., Smith J.L., (2001) Update: Food Poisoning and Other Diseases Induced by *Bacillus cereus*, In: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR, Editors, *Foodborne Disease Handbook*, New York: Markel Dekker, Inc., 61–76.

Ranjbar, R., Behzadi, P., Najafi, A., & Roudi, R. (2017). DNA microarray for rapid detection and identification of food and water borne bacteria: from dry to wet lab. *The open microbiology journal*, 11, 330.

Sachse, K. (2004). Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Molecular biotechnology*, 26, 61-79.

Sağlam, D., & Şeker, E. (2016). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler.

Salazar, J. K., Wang, Y., Yu, S., Wang, H., & Zhang, W. (2015). Polymerase chain reaction-based serotyping of pathogenic bacteria in food. *Journal of microbiological methods*, 110, 18-26.

Saravanan, A., Kumar, P. S., Hemavathy, R. V., Jeevanantham, S., Kamalesh, R., Sneha, S., & Yaashikaa, P. R. (2021). Methods of detection of food-borne pathogens: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 189-207.

Sayad, A., Ibrahim, F., Uddin, S. M., Cho, J., Madou, M., & Thong, K. L. (2018). A microdevice for rapid, monoplex and colorimetric detection of foodborne pathogens using a centrifugal microfluidic platform. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 96-104.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17:7–15.

Schaffner N., Zumstein J., Parriaux A. (2004) Factors influencing the bacteriological water quality in mountainous surface and groundwaters. *Acta Hydroch Hydrob* 32: 225–234.

Shang, Q., Su, Y., Liang, Y., Lai, W., Jiang, J., Wu, H., & Zhang, C. (2020). Ultrasensitive cloth-based microfluidic chemiluminescence detection of *Listeria monocytogenes* hlyA gene by hemin/G-quadruplex DNAzyme and hybridization chain reaction signal amplification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 3787-3797.

Shehata, A., Hershan A. (2016). Boiling, Freezing-thawing and Simple Chemical Extraction Methods are Comparable to Costly Kit-based Bacterial DNA Extraction Methods as Evidenced by Conventional and Real-time PCR. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 25:1, 45-51.

Shen, Y., Xu, L., & Li, Y. (2021). Biosensors for rapid detection of Salmonella in food: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 149-197.

Shuldiner, A. R., Nirula, A., & Roth, J. (1989). RNA template-specific polymerase chain reaction (RT-PCR): A novel strategy for the preparation and use of specific probes. *Nucleic Acids Research*, 17(11), 4401-4411. doi:10.1093/nar/17.11.4401

Singh, D., Sharma, A., & Saini, G. K. (2013). Biochemical and molecular characterisation of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region. *3 Biotech*, 3, 205-212.

Tait, E., Perry, J. D., Stanforth, S. P., & Dean, J. R. (2014). Use of volatile compounds as a diagnostic tool for the detection of pathogenic bacteria. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 53, 117-125.

Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1-4), 37-61.

Tortajada-Genaro, L. A., Lucío, M. I., & Maquieira, Á. (2022). Fast DNA biosensing based on isothermal amplification, unmodified gold nanoparticles, and smartphone detection. *Food Control*, 137, 108943.

Tutar E., Köksalan E., Akyol İ. (2015). Gıdalarda Bulunan Mikrobiyal Patojenlerin Karakterizasyonunda Real Time PCR Teknolojisi, *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 18(4).

U.S. Food and Drug Administration. (2021). Foodborne Pathogens. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens>

ur Rahman, U., Shahzad, T., Sahar, A., Ishaq, A., Khan, M. I., Zahoor, T., & Aslam, S. (2016). Recapitulating the competence of novel & rapid monitoring tools for microbial documentation in food systems. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 62-66.

Valderrama, W. B., Dudley, E. G., Doores, S., & Cutter, C. N. (2016). Commercially available rapid methods for detection of selected food-borne pathogens. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), 1519-1531.

Valentini, P., & Pompa, P. P. (2013). Gold nanoparticles for naked-eye DNA detection: smart designs for sensitive assays. *RSC advances*, 3(42), 19181-19190.

Wang, X., Dang, E., Gao, J., Guo, S., Li, Z. (2013) Development of a gold nanoparticle-based oligonucleotide microarray for simultaneous detection of seven swine viruses. *J Virol Methods*, 191(1), 9-15.

Wang, X., Ying, S., Wei, X., & Yuan, J. (2017). Development of a gold nanoparticle-based universal oligonucleotide microarray for multiplex and low-cost detection of foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, 253, 66-74.

Wang, Y., & Salazar, J. K. (2016). Culture-independent rapid detection methods for bacterial pathogens and toxins in food matrices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 183-205.

World Health Organization. (2020). Food Safety. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Wöhrle, J., Krämer, S. D., Meyer, P. A., Rath, C., Hügler, M., Urban, G. A., & Roth, G. (2020). Digital DNA microarray generation on glass substrates. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.

Yan, S., Wang, S., Qiu, J., Li, M., Li, D., Xu, D., ... & Liu, Q. (2021). Raman spectroscopy combined with machine learning for rapid detection of food-borne pathogens at the single-cell level. *Talanta*, 226, 122195.

Yu, S., Tang, Y., Yan, M., Aguilar, Z. P., Lai, W., & Xu, H. (2019). A fluorescent cascade amplification method for sensitive detection of Salmonella based on magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and hybridization chain reaction. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 279, 31-37.

Yun, W., Jiang, J., Cai, D., Zhao, P., Liao, J., & Sang, G. (2016). Ultrasensitive visual detection of DNA with tunable dynamic range by using unmodified gold nanoparticles and target catalyzed hairpin assembly amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 421-427.

Zanoli, L. M., & Spoto, G. (2012). Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors*, 3(1), 18-43.

Zeng, Y., Qi, P., Wang, Y., Chen, C., & Zhang, D. (2021). DNA pom-pom nanostructure as a multifunctional platform for pathogenic bacteria determination and inactivation. *Biosensors and Bioelectronics*, 177, 112982.

Zhang, J. X., Fang, J. Z., Duan, W., Wu, L. R., Zhang, A. W., Dalchau, N., ... & Zhang, D. Y. (2018). Predicting DNA hybridization kinetics from sequence. *Nature chemistry*, 10(1), 91-98.

Zhang, R., Belwal, T., Li, L., Lin, X., Xu, Y., & Luo, Z. (2020). Nanomaterial-based biosensors for sensing key foodborne pathogens: Advances from recent decades. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1465-1487.

Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., & Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(3), 297-312.

Zhong, Z., Gao, X., Gao, R., & Jia, L. (2018). Selective capture and sensitive fluorometric determination of *Pseudomonas aeruginosa* by using aptamer modified magnetic nanoparticles. *Microchimica Acta*, 185, 1-8.

Zhu, F. F., Peng, J., Huang, Z., Hu, L. M., Zhang, G. G., Liu, D. F., ... & Lai, W. H. (2018). Specific colorimetric ELISA method based on DNA hybridization reaction and non-crosslinking gold nanoparticles aggregation for the detection of amantadine. *Food chemistry*, 257, 382-387.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nazlı Ayyıldız

