

**T.C.  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
GIDA BİLİMLERİ BİLİM DALI**

**SHIGATOKSİN ÜRETEN *Escherichia coli*'LERİN SOSİSLERDE  
CANLILIĞININ VE ASİT DAYANIMININ İNCELENMESİ**

**S. BETÜL BOZATLI**

**Danışman  
Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ**

**II. Danışman  
Prof. Dr. Bülent ERGÖNÜL**



**MANİSA-2019**

**S.Betül  
BOZATLI**

**SHIGATOKSİN ÜRETEN *Escherichia coli* LERİN SOSİSLERDE CANLILIĞININ VE ASİT  
DAYANIMININ İNCELENMESİ**

**2019**

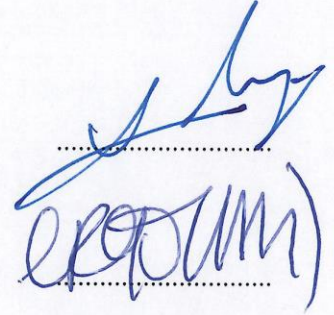
**Tez Sırtı Örneği**

## TEZ ONAYI

S.Betül BOZATLI tarafından hazırlanan "**SHİGATOKSİN ÜRETEN ESCHERİCHİA COLİLERİN SOSİSLERDE CANLILIĞININ VE ASİT DAYANIMININ İNCELENMESİ**"adlı tez çalışması 10/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

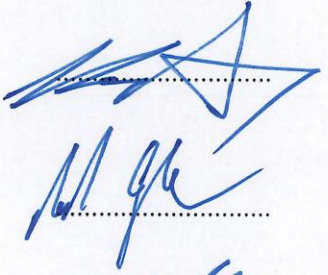
**Danışman**

**Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ**  
Uşak Üniversitesi



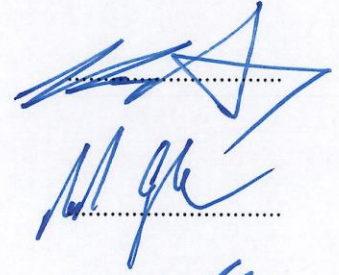
**2.Danışman**

**Prof. Dr. Bülent ERGÖNÜL**  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Semra KAYAARDI**  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



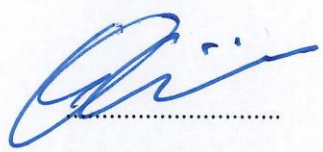
**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU**  
Fırat Üniversitesi



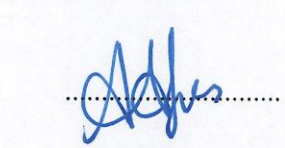
**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. İlkin ŞENGÜN**  
Ege Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Onur GÜNEŞER**  
Uşak Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Dr. Öğr. Üyesi Ash AKPINAR**  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**S.Betül BOZATLI**



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLO DİZİNİ .....	V
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT .....	IX
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.1.1. Enteropatojenik <i>E.coli</i> (EPEC).....	9
2.1.2. Enterotoksijenik <i>E.coli</i> (ETEC).....	11
2.1.3. Enteroinvazif <i>E.coli</i> (EIEC) .....	11
2.1.4. Difuz-adherent <i>E.coli</i> (DAEC) .....	12
2.1.5. Enteroagregatif <i>E.coli</i> (EAEC).....	13
2.1.6. Enterohemorejenik <i>E.coli</i> (EHEC) .....	13
2.1.7. Shigatoksijenik <i>E.coli</i> (STEC) .....	14
2.2. <i>E.coli</i> Asit Dayanımı (AR) ve Asit Tolerans Cevabı (ATR) .....	17
2.2.1. Oksidatif Sistem (AR1) .....	20
2.2.2. Glutamat Dekarboksilaz Sistemi (AR2) .....	20
2.2.3. Arginin Dekarboksilaz Sistemi (AR3).....	20
2.2.4. Asit Stresine Fizyolojik Adaptasyonlar .....	21
2.2.5. <i>E.coli</i> Suşlarının Asit Dayanımını Etkileyen Diğer Faktörler .....	22
2.2.5.1. Aerobik Ortam .....	22
2.2.5.2. Anaerobik Ortam .....	22
2.2.5.3. Strese Önceden Maruz Kalma .....	23
2.2.5.3. DNA Tamir Mekanizması .....	23
2.3. STEC ve Gıda İlişkisi.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.2. Yöntemler.....	32
3.2.1. Sosis Yüzeyine Patojenlerin İnokulasyonu .....	32
3.2.1.1. Kültürlerin Hazırlanması .....	34
3.2.1.2. İnokulumun Hazırlanması .....	34
3.2.1.3. İnokulasyonun Gerçekleştirilmesi .....	35
3.2.2. Mikrobiyolojik Analizler .....	36
3.2.2.1. Toplam Mezofil Aerob Bakteri Sayımı .....	36
3.2.2.2. Psikrofil Bakteri Sayımı .....	36
3.2.2.3. Maya Sayımı.....	36
3.2.2.4. Koliform Bakteri Sayımı .....	36
3.2.2.5. Laktik Asit Bakteri Sayımı .....	36
3.2.2.6. <i>E.coli</i> O157 ve Non-O157 Sayımı.....	36
3.2.3. Sentetik Mide Sıvısında Asit Dayanımı Testleri .....	37
3.2.4. Fizikokimyasal Analizler.....	38
3.2.4.1. Nem Tayini .....	38
3.2.4.2. Protein Tayini .....	38
3.2.4.3. Yağ Tayini .....	39

3.2.6.4. Tuz Tayini .....	39
3.2.6.5. pH Ölçümü .....	39
3.2.5. İstatistiksel Analiz .....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	41
4.1. Sosis Örneklerinin Bazı Kimyasal Özellikleri .....	42
4.2. STEC Serogruplarının Sentetik Mide Sıvısı İçerisindeki Yaşamları .....	42
4.3. Sosis Örneklerinde Depolama Süresince Meydana Gelen Mikrobiyal Değişimler .....	45
4.3.1. Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Patojenlerin ve Rekabetçi Floranın Canlılığı .....	45
4.3.1.1. STEC O103 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .....	46
4.3.1.2. STEC O26 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .....	47
4.3.1.3. STEC O145 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .....	48
4.3.1.4. STEC O157 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .....	49
4.3.1.5. Depolama Süresince Grup 1A Sosislerde Rekabetçi Floranın Değişimi .....	50
4.2.2. Grup 1B Sosislerde Depolama Süresince Patojenlerin ve Rekabetçi Floranın Canlılığı .....	55
4.2.3. Grup 2 Sosislerde Patojenlerin ve Rekabetçi Floranın Depolama Süresince Canlılığı .....	58
4.4. Sentetik Mide Sıvısı Deneyleri Sonuçları .....	61
4.4.1. Grup 1A Sosislerdeki Patojenlerin SMS Deneylerinde Canlılıkları .....	57
4.4.2. Grup 1B Sosislerde Patojenlerin SMS Deneylerinde Canlılığı .....	66
4.4.3. Grup 2 Sosislerde Patojenlerin SMS Deneylerinde Canlılığı .....	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	86
KAYNAKLAR .....	90
ÖZGEÇMİŞ .....	103

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>CDC</b>	Center For Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi)
<b>DAEC</b>	Difuz-adherent <i>E.coli</i>
<b>DRBC Agar</b>	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EAEC</b>	Enteroagregatif <i>E.coli</i>
<b>EHEC</b>	Enterohemorajik <i>E.coli</i>
<b>EIEC</b>	Enteroinvazif <i>E.coli</i>
<b>EPEC</b>	Enteropatojenik <i>E.coli</i>
<b>ETEC</b>	Enterotoksijenik <i>E.coli</i>
<b>ExPEC</b>	Ekstraintestinal patojenik <i>E.coli</i>
<b>EPEC</b>	Enteropatojenik <i>E.coli</i>
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
<b>LAB</b>	Laktik asit bakterisi
<b>MAB</b>	Mezofil Aerob Bakteri
<b>MRS Agar</b>	DE MAN, ROGOSA and SHARPE Agar
<b>PB</b>	Psikrofil Bakteri
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>SMAC</b>	Sorbitol MacKonkey Agar
<b>SMS</b>	Sentetik Mide Sıvısı
<b>STEC</b>	Shigatoksijenik <i>E.coli</i>
<b>UPEC</b>	Üropatojenik <i>E.coli</i>
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture (A.B.D. Tarım Bakanlığı)
<b>VRBA</b>	Violet Red Bile Agar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Diyarejenik <i>E.coli</i> 'nin Patojenik Aksiyon Şemaları.....	5
Şekil 2.2. <i>E.coli</i> Gen Transfer Mekanizmaları.....	6
Şekil 2.3. <i>E.coli</i> Patotipleri Arasındaki İlişkiyi Gösteren Venn diyagramı .....	7
Şekil 2.4 EPEC.....	9
Şekil 2.5 ETEC .....	11
Şekil 2.6 EIEC.....	11
Şekil 2.7 DAEC.....	12
Şekil 2.8 EAEC .....	13
Şekil 2.9 EHEC .....	13
Şekil 2.10 <i>E.coli</i> 'nin Sahip Olduğu AR2 ve AR3 sistemlerinin Özeti .....	21
Şekil 2.11 Sosis Üretim Akış Şeması.....	27
Şekil 3.1 Deneysel Gruplar .....	33
Şekil 3.2 Grup 2 Sosislerin Üretimi .....	33
Şekil 3.3 Kültürlerin Hazırlanması .....	35
Şekil 3.4 İnokulumun Hazırlanması ve İnokulasyonun Gerçekleştirilmesi.....	35
Şekil 3.5 Sentetik Mide Sıvısı Dayanım Analizleri .....	37
Şekil 4.1 STEC Serogruplarının Sentetik Mide Sıvısında (pH 1,5) Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimler .....	43
Şekil 4.2 STEC O103 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .46	46
Şekil 4.3 STEC O26 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi...47	47
Şekil 4.4 STEC O145 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .48	48
Şekil 4.5 STEC O157 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .49	49
Şekil 4.6 Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Mezofil Aerob Bakteri Sayısındaki Değişim.....	51
Şekil 4.7 Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Laktik Asit Bakterileri Sayısındaki Değişim .....	52
Şekil 4.8 Grup Grup 1A Sosislerde Depolama Boyunca Psikrofil Bakteri Sayısındaki Değişim .....	53
Şekil 4.9 Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Maya Sayısındaki Değişim.....	54
Şekil 4.10 Grup 1B Sosislerde Depolama Süresince STEC Serogruplarının Canlılığı ....56	56
Şekil 4.11 Depolama Süresince Grup 1B Sosislerde Rekabetçi Floradaki Değişim .....	58
Şekil 4.12 Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince STEC Serogruplarının Canlılığı.....59	59
Şekil 4.13 Grup 2 Sosislerde Depolama Boyunca Rekabetçi Floradaki Değişim .....	60
Şekil 4.14 O103 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi.....	62
Şekil 4.15 O26 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi.....	63
Şekil 4.16 O145 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi.....	64
Şekil 4.17 O157 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi.....	65
Şekil 4.19 STEC O26 Canlılığının Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi ....67	67
Şekil 4.20 STEC O103 Canlılığının Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi...68	68
Şekil 4.21 STEC O145 Canlılığının Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi...69	69
Şekil 4.22 STEC O157 Canlılığının Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi...70	70
Şekil 4.24 STEC O26 Canlılığının Grup 2 Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi.....	74
Şekil 4.25 STEC O103 Canlılığının Grup 2 Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi .....	75
Şekil 4.26 STEC O145 Canlılığının Grup 2 Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi.....	76
Şekil 4.27 STEC O157 Canlılığının Grup 2 Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi.....	77



## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1 <i>Escherichia</i> Patojenik Gruplarının Enfeksiyon Bölgeleri ve Patojenite Mekanizmaları .....	9
Tablo 2.2. CDC Tarafından Raporlanan STEC Salgınları .....	25
Tablo 4.1 Sosis Örneklerinin Bazı Kimyasal Özellikleri .....	42
Tablo 4.2 STEC Serogruplarının Sentetik Mide Sıvısında (pH 1,5) Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimler .....	42
Tablo 4.3 STEC O103 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .....	46
Tablo 4.4 STEC O26 Yaşamının Grup 1A Sosislerde 75 Günlük Depolama Boyunca Değişimi .....	47
Tablo 4.5 STEC O145 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .....	48
Tablo 4.6 STEC O157 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi .....	49
Tablo 4.7 Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Mezofil Aerob Bakteri Sayısındaki Değişim .....	50
Tablo 4.8 Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Laktik Asit Bakterileri Sayısındaki Değişim .....	51
Tablo 4.9 Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Psikrofil Bakteri Sayısındaki Değişim .....	52
Tablo 4.10 Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Maya Sayısındaki Değişim .....	53
Tablo 4.11 Grup 1B Sosislerde Depolama Süresince STEC Serogruplarının Canlılığı .....	56
Tablo 4.12 Grup 1B Sosislerde Depolama Süresince Rekabetçi Floradaki Değişim .....	57
Tablo 4.13 Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince STEC Serogruplarının Canlılığı .....	58
Tablo 4.14 Grup 2 Sosislerde Depolama Boyunca Rekabetçi Floradaki Değişim .....	59
Tablo 4.15 O103 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi .....	61
Tablo 4.16 O26 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi .....	62
Tablo 4.17 O145 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi .....	63
Tablo 4.18 O157 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi .....	64
Tablo 4.19 Grup 1A Örneklerde Depolama Süresince pH ve % Laktik Asit Değişimi .....	66
Tablo 4.20 STEC O26'nın Depolama Süresince Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi .....	67
Tablo 4.21 STEC O103'ün Depolama Süresince Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi .....	68
Tablo 4.22 STEC O145'in Depolama Süresince Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi .....	69
Tablo 4.23 STEC O157'nin Depolama Süresince Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi .....	70
Tablo 4.24 Depolama Boyunca Grup 1B Örneklerde pH ve % Laktik Asit Değişimi .....	71
Tablo 4.25 STEC O26'nın Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince SMS Deneylerinde Değişimi .....	73

Tablo 4.26 STEC O103'ün Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince SMS Deneylerinde Değişimi .....	74
Tablo 4.27 STEC O145'in Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince SMS Deneylerinde Değişimi .....	75
Tablo 4.28 STEC O157'in Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince SMS Deneylerinde Değişimi.....	76
Tablo 4.29 Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince pH ve % Laktik Asit Değişimleri .....	78



## TEŞEKKÜR

Öncelikle kendisiyle karşılaşmış olmaktan dolayı oldukça şanslı hissettiğim, çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ' ye; bu süreçte bana bilgisi ve hoşgörüsü ile destek olduğu, yol gösterdiği ve hatta zaman zaman dert paydaşı olduğu, akademik ve sosyal birçok konuda bana örnek olduğu ve bana güvendiği için minnetlerimi sunmak isterim.

Lisans öğrenimimden bu yana her türlü desteğini ve rehberliğini benden esirgemeyen ikinci danışmanım sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ERGÖNÜL' e; tanıştığımız günden bugüne her konuda kapısını rahatlıkla çalabildiğim, hiçbir zaman benden zamanını ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Dr.Öğr.Üyesi Aslı AKPINAR'a; yardımlarından dolayı Sayın Doç.Dr. Onur GÜNEŞER'e, desteklerinden dolayı çalışma arkadaşlarım ve özellikle de Ceyda SÖBELİ'ye; bana sabır ve anlayış gösteren, zorluklarımı kolaylaştırmak için çaba sarfeden, benim hayattaki en büyük nimetlerimden olan sevgili eşim Alparslan BOZATLI'ya; doktora sürecimi benim kadar önemseyen benim için dualar eden, bana maddi manevi destek veren ailelerimize yürekten teşekkür ederim.

S.Betül BOZATLI  
Manisa, 2019

## ÖZET

### Doktora Tezi

## SHIGATOKSİN ÜRETEEN *Escherichia coli*'LERİN SOSİSLERDE CANLILIĞININ VE ASİT DAYANIMININ İNCELENMESİ

S.Betül BOZATLI

Manisa Celal Bayar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ

### II. Danışman: Prof.Dr. Bülent ERGÖNÜL

Bu çalışma *E.coli* O157:H7 ve non-O157 “big six” serogruplarından olan O103, O26 ve O145'in emülsifiye sosislerin 4°C'de depolanması sırasında canlılığı ve sentetik mide sıvısına dayanımlarını incelemek amacıyla gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında perakende satış noktalarından temin edilen ve deneysel üretimi yapılan sosislere patojenler bulaştırılarak (5,0+1,00 log<sub>10</sub> kob/g) vakum ambalaj içerisinde 75 gün depolandı. Depolamanın 0, 15, 30, 45, 60 ve 75. gününde patojenlerin sayıları ve sentetik mide sıvısı içerisindeki asit dayanımları incelendi. Deneme grupları piyasadan toplanan sosisler (Grup 1A ve 1B) ve deneysel üretilen sosisler (Grup 2) şeklinde sınıflandırıldı.

Grup 1A örneklerinde patojenler depolama süresince farklı düzeylerde canlılıklarını korudu. Bu grup örneklerde, depolamanın 0. günü haricinde sentetik mide sıvısına dayanım tespit edilmedi. Grup 1A sosis örneklerindeki denemeler sonucunda bir markada sentetik mide sıvısı dayanımının diğer markalara göre daha uzun olduğu tespit edildiğinden bu markaya ait sosisler ile 3 tekrar halinde denemeler yapıldı ve bu grup Grup 1B olarak sınıflandırıldı. Grup 1B örneklerinin sentetik mide sıvısı deneylerinde patojenlerin canlılıkları STEC O26 ve O145'te 60. günden itibaren, O103'te 75. günde, O157'de ise 45. günden itibaren tespit limitinin altına düştüğü belirlendi. Perakende satış noktalarından temin edilen sosislerde veriler elde edildikten sonra deneysel olarak sosis üretimi yapıldı ve bu örnekler Grup 2 olarak sınıflandırıldı. Bu grup örneklerde sentetik mide sıvısı dayanımları, STEC O157'de 45. günden itibaren azalarak 75. günde tespit edilemedi. Öte yandan STEC O103, O26 ve O145'in 75. günde dahi sentetik mide sıvısına 90 dakika boyunca dayanım gösterdikleri tespit edildi.

Çalışma sonucunda, STEC patojenlerinin canlılıkları ve sentetik mide sıvısına dayanımlarına etki eden faktörlerin, suş tipi, sosis pH'sı ve rekabetçi flora gibi faktörler olduğu belirlendi. STEC enfektif dozunun oldukça düşük olduğu göz önüne alındığında, bulaşma söz konusu olduğunda sosisin risk teşkil edebilecek bir gıda olduğu söylenebilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *E.coli* O157:H7, non-O157, asit dayanımı, sentetik mide sıvısı, sosis  
2019, 104 sayfa

## ABSTRACT

PhD Thesis

### INVESTIGATING THE SURVIVAL AND ACID RESISTANCE OF SHIGATOXIN PRODUCING *Escherichia coli* IN FRANKFURTERS

S.Betül BOZATLI

Manisa Celal Bayar University  
Graduate School of Applied and Natural Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdullah DİKİCİ

Co-Supervisor: Prof. Dr. Bülent ERGÖNÜL

In this study, survival and synthetic gastric fluid resistance of *E.coli* O157:H7 and “big six” non-O157 serogroups; O103, O26 and O145 were investigated during storage at 4°C of frankfurters. Frankfurters obtained from local stores and experimentally produced frankfurters were inoculated with the STEC pathogens (around 5,0+1,00 log<sub>10</sub>cfu/g) and stored in vacuum packages for 75 days. Pathogen counts and acid survival in synthetic gastric fluid were evaluated on 0, 15, 30, 45, 60 and 75 days of storage. Treatment groups were divided as frankfurters obtained from stores (Group 1A and Group 1B) and experimentally produced frankfurters (Group 2).

The pathogens did not show any resistance to synthetic gastric fluid after the first day (Day 0) of storage in Group 1A samples. The results of experiments on Group 1A samples showed, on one brand of frankfurters pathogens had longer synthetic gastric fluid resistance and therefore this brand was chosen for further experiments. Frankfurters of this brand were grouped as Group 1B and triplicate experiment results were reported. Synthetic gastric fluid experiments in this group of samples showed that pathogen counts during SGF exposure decreased below detection limit after 60 days of storage for STEC O26 and O145, on the 75th day for STEC O103 and after 45 days for STEC O157. After obtaining the results from the Group 1A and Group 1B frankfurters, experimental production was performed and these samples were grouped as Group 2. In this group of samples STEC O157 survival during synthetic gastric fluid exposure decreased after 45 days of storage and decreased below detection limit on the 75th day of storage. On the other hand STEC O103, O26 and O145 survived the SGF exposure for 90 minutes even on the 75th day of storage.

As a result of this study, it can be concluded that survival and synthetic gastric fluid resistance of STEC pathogens were affected by factors such as strain, pH of the frankfurter, and competitive microflora. Taking into account that the STEC infective dose is quite low, it can be said that frankfurters might pose a food safety risk if STEC contamination occurs.

**Keywords:** *E.coli* O157:H7, non-O157, acid resistance, synthetic gastric fluid, sausage  
2019, 104 pages

## 1. GİRİŞ

Shiga-toksin üreten *Escherichia coli* (STEC) suşları dünya çapında birçok salgından sorumlu olan gıda kaynaklı patojenlerdir. Geviş getiren hayvanların bağırsaklarında bulunan STEC, fekal yolla gıda ve suyun kontaminasyonuna neden olabilmektedir [1]. Bu patojenler insanlarda orta ve yüksek şiddette hastalıklara neden olabilmekte, hastalık hemorajik kolit (HC) ve hemolitik uremik sendroma (HUS) kadar ilerleyebilmektedir [2]. *Escherichia coli* (*E.coli*) O157:H7 dışındaki STEC serogruplarına non-O157 STEC'ler denilmektedir [3].

Son yıllarda birçok non-O157 STEC serogrubu gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Daha özel olarak STEC O26, O45, O103, O111, O121 ve O145 Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı hastalık vakaları ile ilişkilendirilen non-O157 serogruplarının %75'ini oluşturmaktadır [4]. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) bu STEC serogruplarına "top six/ big six" adını vermiştir [5].

STEC serotiplerinin enfektif dozunun oldukça düşük olmasının sahip oldukları asit dayanımı kabiliyetleri ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir. En önemli bulaşma kaynağı, sığır eti ve ürünleri olmak üzere çeşitli gıdalar ile enfeksiyona neden olabilmektedirler [5].

Ülkemizde sıklıkla tüketilen et ürünlerinden sosis, emülsiyon teknolojisi ile hazırlanan hamurun doğal veya yapay kılıflara doldurulduktan sonra belli aralıklarla boğumlanarak, tütsüleme ve pişirme işlemlerine tabi tutulması ile elde edilen bir üründür [6]. Sosis üretiminde uygulanan pişirme işleminin tüm mikroorganizmaların öldürülmesi için yetersiz olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [7]. Bunun yanı sıra sosislere ısıl işlem sonrasındaki üretim basamaklarında çeşitli bulaşmalar olması söz konusu olabilmektedir [8, 9]. Tüketime hazır olarak satışı yapılan sosislerin mikrobiyolojik yükünün yasal limitlerin üzerinde olduğu tespit edilen ve *E.coli* gibi patojenlerin izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır [9, 10].

Gıda kaynaklı patojenlerin hastalığa yol açmaları için öncelikle midenin asidik koşullarına dayanım gösterebilmeleri gerekmektedir. Asit stresi ile baş edebilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiş, asit dayanımı yüksek olan patojenler mide asidinden sıyrılarak çeşitli hastalıklara neden olabilmektedirler. Sosis gibi

soğuk olarak da tüketilebilen bir gıda ürününde Shigatoksijenik *E.coli* gibi asit dayanımı kuvvetli ve patojenitesi yüksek patojenlerin bulaşmasının, gıda kaynaklı hastalık gelişimi açısından oldukça riskli olabileceği düşünülmektedir. Gıda ortamında patojenlerin canlılığını ve çeşitli çevresel streslere dirençliliğini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Dolayısı ile gıdanın bu anlamda risk teşil edip etmediği, bu gıda ortamı ile yapılacak çalışmalar ile daha objektif bir şekilde ortaya koyulabilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında STEC serogruplarının birincil bulaşma kaynağı olan sığır etinden üretilmiş sosislerde, STEC O157:H7 ve “big six” non-O157 serogruplarından olan STEC O103, O26 ve O145’in sosis ortamında depolama boyunca canlılığı ve sentetik mide sıvısına (SMS) dayanımları incelenmiştir. Çalışmada STEC serotiplerinin sosis depolanması sırasında pH, rekabetçi flora ve depolama süresi gibi faktörlerden nasıl etkilendikleri belirlenerek risk profilini ortaya koymak amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) 1885 yılında yenidoğan ve bebeklerin dışkı florasının incelendiği bir çalışmada Theodore Escherich tarafından tanımlanmıştır [11]. Önceleri *Bacterium coli commune* olarak tanımlanan bu bakteri, Dr. Escherich'in onuruna *Escherichia coli* olarak adlandırılmış ve günümüzde üzerinde en çok çalışılan mikroorganizmalardan olmuştur [2].

*E.coli* insan bağırsağının normal florasının bir üyesi olup kolonizasyonu doğumdan kısa bir süre sonra gerçekleşmektedir. Dolayısıyla, birçok suşu patojenik olmayıp konakçısı ile simbiyotik bir ilişki içinde yaşamaktadır. Bu ilişkide bakteri konakçıdan fayda sağlarken, kofaktörler sentezleyerek patojen mikroorganizmalara karşı dirence de katkı sağlamaktadır [11, 12]. Öte yandan *E.coli*'nin küçük bir grubu evrilmekle insan konakçısında ağır ishalleri hastalıklar ve ciddi doku bozukluklarına (sekel) neden olabilecek patojenik stratejiler geliştirmiştir [13,14]. *E.coli*'nin bazı suşlarının gastroenteritte rol oynadığı 1945 yılında Bray ve ark. [14] tarafından tespit edilerek enteropatojenik *E.coli* (EPEC) şeklinde ilk patotip grubu adlandırılması gerçekleştirilmiştir [15].

*Escherichia* cinsi, başlıca habitatı insan ve hayvan bağırsağı olan *Enterobacteriaceae* familyasının üyesidir [11]. *E. coli*, *E. albertii*, ve *E. fergusonii*; *Escherichia* cinsinde tanımlanmış türlerdir [16]. *E.coli*, familyanın diğer üyeleri ile ve özellikle *Shigella* ile yakın akrabalığı bulunan bir Gram negatif çubuk şekilli bakteridir. Spor oluşturmaz, peritrik flajella sayesinde genellikle hareketli, fibrilli, tek veya çiftler halinde gözlenebilen bir bakteridir [12]. İçeriğinde besin maddesi olarak yalnızca gliserol veya glukoz gibi maddeler bulunan basit besiyerlerinde bile üreyebilmektedir. İndol üreten, sitrat fermantasyonuna sahip olmayan, metil red testi pozitif, üreaz ve Voges-Proskauer reaksiyonları negatif olan bir bakteridir [13].

Bu mikroorganizmalar oldukça geniş aralıkta çevresel koşullara iyi bir şekilde adapte olarak 7-49°C sıcaklık aralığında; 4,5-9 pH aralığında ve %6,5 tuz konsantrasyonlarına kadar gelişim gösterebilmektedirler. Bununla beraber optimum üreme sıcaklıkları 35- 37°C'dir [17]. 5°C'de haftalarca, -20°C'de ise aylar, hatta yıllar boyunca canlı kalabilmektedirler [18].



Anaerobik koşullarda fermente edilebilir karbonhidratlara gereksinim duymaktadırlar. Glukozu pirüvata fermente ederler, daha sonra pirüvat, laktik, asetik ve formik aside dönüştürölür. Formik asidin bir kısmı format-hidrojenliyz enzim kompleksi ile hidrojen ve karbon dioksite dönüştürölürken, bazı suşlar gaz üretmezler (anaerogenik) [12].

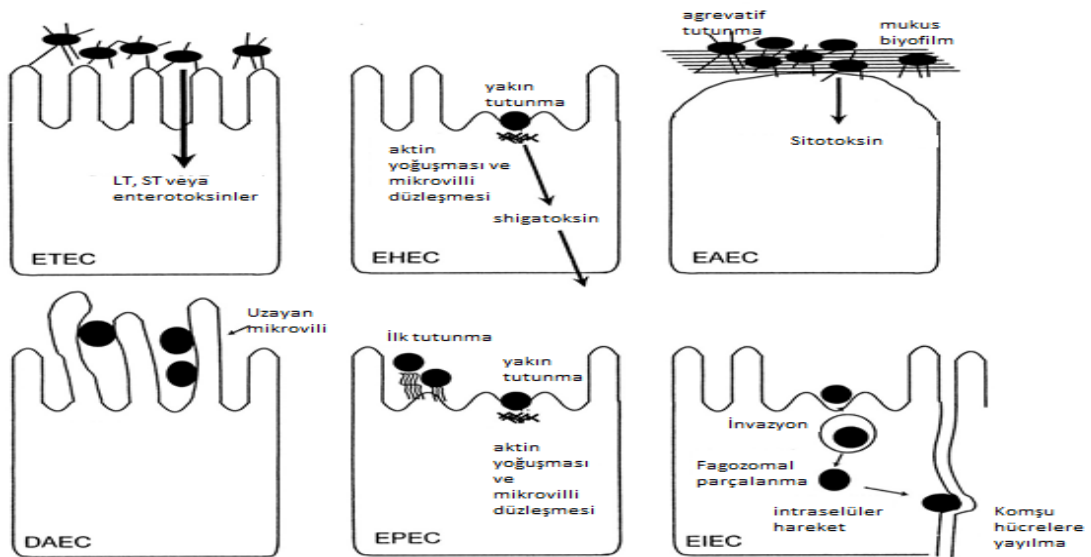
Kuşlar, domuzlar, büyükbaş hayvanlar (sığır), tavşanlar, koyunlar ve insanlar konakçılardır. Gastrointestinal sistem ve böbrekler patojenik *E.coli*'nin hedefidir. İşhal, dizanteri, sepsis, hemolitik üremik sendrom (HUS) ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) neden olduğu hastalık ve komplikasyonlardandır [12].

*E.coli* patojenitesi suşa göre değişim göstermektedir. Türlerin hastalık yapma kabiliyetlerindeki farklılık, virölans faktörleri kodlayan spesfik genlerin varlığı ve gen alışverişi kapasitesi ile ilişkilidir. *E.coli*'nin bakteriyel rekombinasyonu ilk olarak Tatum and Lederberg (1947) tarafından tanımlamış ve çeşitli *E.coli* suşlarının plasmidlerinde var olan çok sayıda patojenik faktör sayesinde, suşların yeni genler elde ettiği konjugasyon ile gen transferinin bu bakteriler için önemli bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır. Diğer kritik virölans belirleyicileri bakteriyofaj genomlarında veya patojenite adalarında kodlanmıştır. Patojenik *E.coli* apatojenik *E.coli*'de bulunmayan yüzlerce DNA bloğuna sahip olabilir. Bunun yanında tüm suşlar birçok entegre bakteriyofaj genomuna sahiptir ve *E.coli* suşlarının patojenik potansiyelinin, genomlarındaki spesfik virölans gen çeşidine bağlı olduğu söylenebilmektedir [11,12].

Doğada toprak, su ve genellikle fekal kaynaklar sayesinde, birincil habitatından ulaşım sağlayabileceği herhangi bir kaynakta bulunabilmektedir. Bazı serogrupların insan fekal florasındaki yaygınlığı, bağırsakta uzun süre varlığını sürdürebilme (ısrarla tutunma) kapasitelerine bağlı olarak diğerlerine göre daha fazla olmaktadır [12].

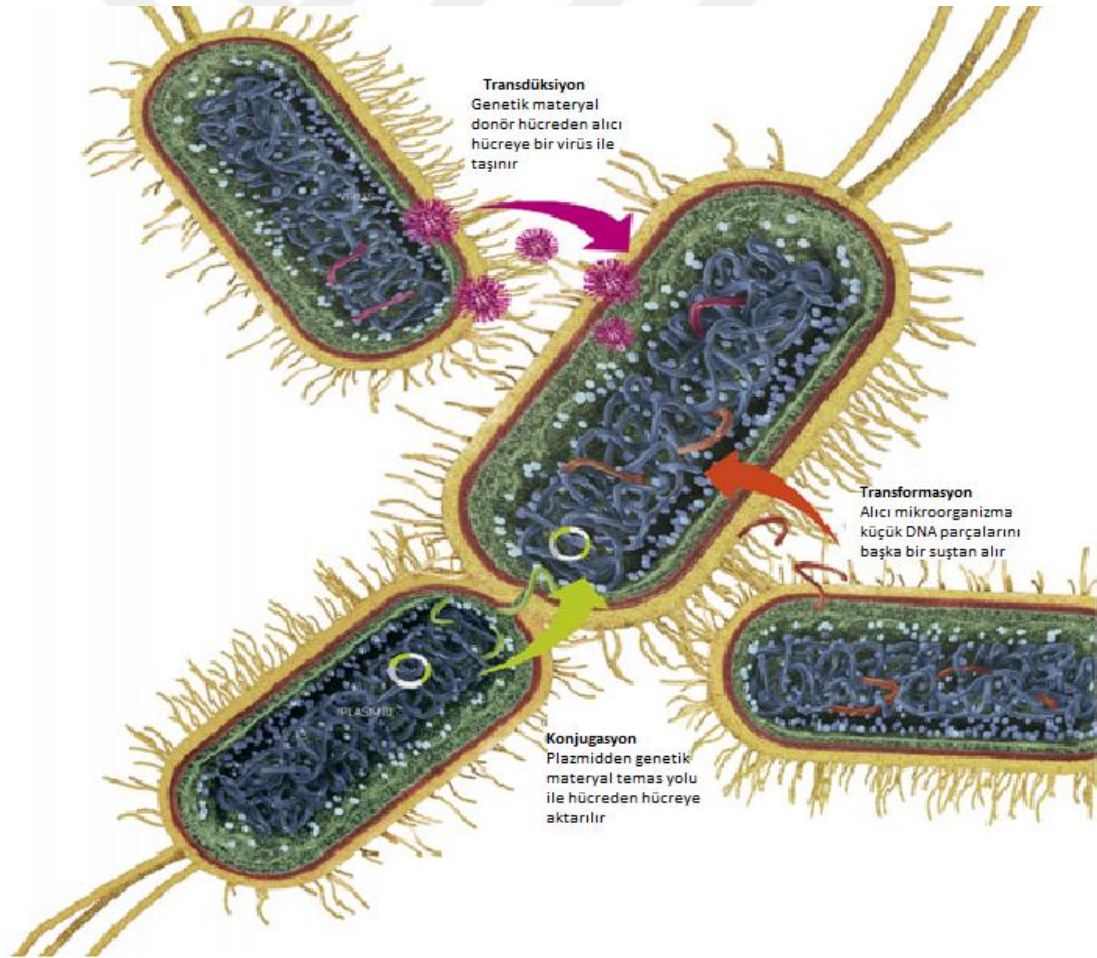
*E.coli* izolatları, O (somatik), H (Flajellar) ve K (kapsöl) antijeni olarak 3 temel antijen sayesinde serotipik olarak karakterize edilmektedir. Ayrıca fibrilli suşlar fibril antijenleri ile sınıflandırılabilir [13].

*E.coli*, çok genel olarak üç grup altında sınıflandırılabilir. İlk grup virulent olmayan, bağırsak mikrobiyotasının doğal bir parçası olan suşları; ikinci grup oportunistik patojen suşların yer aldığı, genellikle immün sistemi zayıf veya baskılanmış bireylerde hastalığa neden olan suşları; üçüncü grup ise dünya çapında çeşitli salgın ve hastalıklara neden olan başlıca toplum sağlığı tehditlerinden olan patojenik *E.coli* suşlarını kapsamaktadır [17]. Patojenik *E.coli* de kendi içerisinde klinik özelliklerine göre diyarejenik *E.coli*, uropatojenik *E.coli*, meninks-sepsis-ilişkili *E.coli* ve avian (kuş) patojenik *E.coli* şeklinde gruplara ayrılmaktadır [19]. Diyarejenik *E.coli* ise yol açtığı hastalık tipleri ve virülans faktörleri ile patotiplerine sınıflandırılmaktadır. İnsanlarda hastalık yapan bu intestinal patotipler enteropatojenik *E.coli* (EPEC), enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), enteroagregatif *E.coli* (EAEC), enteroinvaziv *E.coli* (EIEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Vero-veya Shiga-toksin üreten *E. coli* (VTEC veya STEC), diffuz aderent *E. coli* (DAEC) olarak sınıflandırılmaktadır [20,21]. EHEC grubu aslen STEC'nin bir alt grubu olarak kabul edilmektedir [22]. Bunun dışında insanda ve hayvanda idrar yolu enfeksiyonu, meninks septisemi (beyin ve omurilik zarları iltihabı) gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen bağırsak dışı patojenik *E.coli* (ekstraintestinal, ExPEC) suşları da bulunmaktadır [13,23]. Patojenik *E.coli* virülans özellikleri, patojenite mekanizması, klinik sendromları ve farklı O:H serogruplarına göre kategorize edilmektedir [12, 13, 24]. Diyarejenik *E.coli* patojenik aksiyonları Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



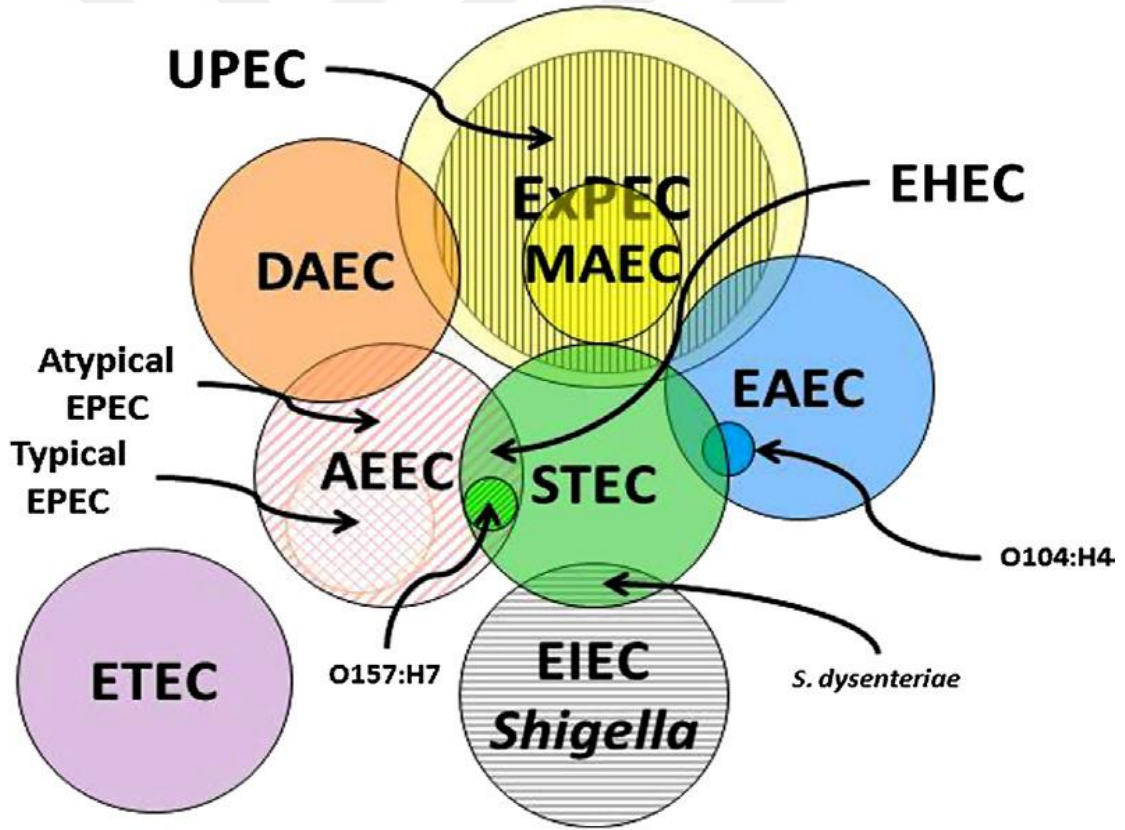
Şekil 2.1: Diyarejenik *E.coli*'nin Patojenik Aksiyon Şemaları [25]

*E.coli* terminolojisi, yeni patojenlerin ortaya çıkması, çok sayıda *E.coli* patotipinin tanımlanmış olması, farklı patotiplere verilen benzer isimler ve bunların literatürdeki kullanımlarındaki tutarsızlıklar gibi sebepler dolayısıyla karmaşık ve anlaşılması zor bir haldedir. Bazı *E.coli* grupları ve suşlarının benzer virülans özellikleri gösterebileceği ve çeşitli patotiplerin patogenez mekanizmalarında örtüşmeler görülebildiğini belirtmek gerekmektedir. Örneğin hem EPEC hem de EHEC grupları, patojenin intestinal hücrelere tutunmasını sağlayan bir protein olan intimini üretmektedir [13] veya Tip III salgı sistemleri EPEC, EHEC ve EIEC grubu bakterilerin patogenezlerinde ortak olarak önemli rol oynamaktadır. Yine Tip IV pili ve TipII salgı sistemleri hem EPEC ve hem de ETEC grubu bakterileri tarafından eksprese edilmektedir. RTX familyası hemolisinleri, ekstraintestinal enfeksiyona neden olan birçok *E.coli* suşu, EHEC ve zaman zaman da intestinal enfeksiyona neden olan diğer suşlar tarafından üretilmektedir [26].



Şekil 2.2: *E.coli* Gen Transfer Mekanizmaları [27]. Transdüksiyon, konjugasyon ve transformasyon ile gen transferi

Patojenik *E.coli* gruplarının taşıdığı virülans genlerinin çoğu mobil genetik elementlerde olup, suşlar arasında transfer edilerek “yeni” suşlar oluşturabilmektedir (Şekil 2.2). Bu tip bir transfer Almanya’da 2011 yılında gerçekleşen *E.coli* salgınına neden olan O104:H4 (non-O157 STEC) suşunda tespit edilmiştir [13]. Virülans faktörleri genellikle bakteriyofajlar gibi mobil elementlerde bulunmakta ve böylelikle organizmalar arasında aktarılabilir. Bu şekilde bazı organizmalar birden fazla patotip karakteristiğine sahip olabilmektedirler. 2011 yılında gerçekleşen salgından sonra *E.coli* terminolojisine Enteroagregatif ve enterohemorajik *E.coli* (EAHEC) olarak yeni bir kategori önerilmiştir. Bu özellikteki organizmaları diğer araştırmacılar “enteroagregatif, verotoksin üreten *E.coli*” şeklinde adlandırmaktadır [22]. Suşlar arasındaki bu kompleks bağlantılar Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



Şekil 2.3: *E.coli* Patotipleri Arasındaki İlişkiyi Gösteren Venn diyagramı [26]

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC, sarı; Şekil 2.3) suşları; meninks-ilişkili *E. coli* (MAEC, açık sarı); uropatojenik *E. coli* (UPEC, dik çizgiler, Şekil 2.3); zatürre, kolesistit (safra kesesi tahrişi), peritonit (karın zarı iltihabı), ve diğer

enfeksiyonlara sahip hastalardan izole edilen suşları içermektedir. Bu suşlar birçok ortak virülans faktöre sahiptir ve tek bir klon hem meninks hem de idrar yolu enfeksiyonuna neden olabilmektedir. UPEC arasında bazı suşlar doku kültürü hücrelerine yayılarak tutunma (diffuse adherence) özelliği göstermektedir. Difuz aderent *E.coli* (DAEC, turuncu; Şekil 2.3) ile aynı tutunma mekanizmalarına sahip olabilmektedirler [26].

Shiga-toksinojenik *E.coli* (STEC, yeşil; Şekil 2.3) suşlarından idrar yolları enfeksiyonu ve diğer bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olan suşlar olduğu da rapor edilmiştir. STEC arasında AE-*E.coli* (AEEC: Attaching and effacing *E.coli*; yatay çizgiler; Şekil 2.3) özelliği taşıyanlar da mevcuttur. Hem STEC hem de AEEC grubuna ait suşlar enterohemorejenik *E.coli* (EHEC) olarak bilinmektedir. AEEC grubunda Shigatoksin üretmeyen suşlar enteropatojenik *E.coli* (EPEC) olarak adlandırılmaktadır. EPEC içerisinde birçok suş demet oluşturan (bundle-forming) pili üretmekte ve doku hücrelerine tutunabilmektedir. Bunlara tipik EPEC adı verilmektedir (damalı kısım, Şekil 2.3). Öte yandan bu iki özelliğe de sahip olmayan suşlarına da atipik EPEC adı verilmektedir. Bazı atipik EPEC suşları yayılarak tutunma (diffuse adherence) özelliği göstermektedir. Enteroinvazif *E.coli* (EIEC, yatay çizgili kısım; Şekil 2.3), doku hücrelerini yüksek etkinlikte istila etmekte, sitoplazmada çoğalmakta ve hücreden hücreye yayılabilmektedirler. Bu suşlar içerisinde aslen filogenetik olarak tamamı *E.coli* içerisinde yer alan *Shigella* cinsine ait organizmalar bulunmaktadır. *S. dysenteriae* serogrup 1 suşları Shigatoksin üretebilmekte ve dolayısıyla hem EIEC hem de STEC patotiplerinin üyesi olmaktadır [26].

Enteroaggregatif *E.coli* (EAEC, mavi; Şekil 2.3) akut ve inatçı ishale neden olabilmekte ve tutunma yolları ile tanımlanmaktadır. 2011 yılında ciddi bir salgına neden olan EAEC grubu O104:H4 serotipine ait suş Shigatoksin üretebilmekte ancak diğer EAEC suşları üretememektedir. Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC, mor; Şekil 2.3) akut ishale neden olmakta ve ısıya duyarlı ve/veya ısıya dayanıklı enterotoksin üretmeleri ile tanımlanmaktadır [26].

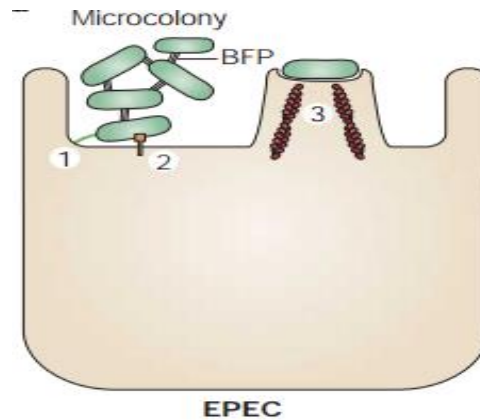
Patojenik *E.coli* diğer mukozal patojenler tarafından da kullanılan; mukozal bölgede kolonize olma, konakçı savunmasını atlama, çoğalma ve konakçıya zarar verme şeklinde çok basamaklı bir patogenezi düzeni izlemektedir [13,24]. Tablo

2.1’de *Escherichia*’nın patojen gruplarının patojenite mekanizmaları gösterilmektedir.

Tablo 2.1: *Escherichia* Patojenik Gruplarının Enfeksiyon Bölgeleri ve Patojenite Mekanizmaları [28].

<i>Escherichia</i> ’nın Patojenik Grupları		Hastalık, Enfeksiyon Bölgesi	Patojenite Mekanizması
<b>Diyarejenik</b>	Enteropatojenik (EPEC)	Sulu ishal, ince bağırsak	Adherans (tutunma)
	Enteroinvazif (EIEC)	Sulu ishal takiben kanlı ishal, kolon	Doku içerisine girme (İnvazyon)
	Enterotoksijenik (ETEC)	Sulu ishal, ince bağırsak	Isıya dayanıklı ve/veya ısıya hassas toksin
	Shiga-benzeri toksin Üreten (STEC) Verotoksijenik (VTEC) Enterohemorojenik (EHEC)	Sulu ishal bazen kanlı, kolon	Shiga toksinler tip 1 ve/veya tip 2
	Enteroadherant (EAEC)	Sulu ishal, ince bağırsak ve kolon	Adherans (tutunma)
	Difüzadherant (DAEC)	Sulu ishal, ince bağırsak	Adherans (tutunma)
<b>Ekstraintestinal (ExPEC)</b>	Uropatojenik (UPEC)	İdrar yolu	Adherans (tutunma), toksinler
	Dolaşım sistemi-/meninksler- ilişkili (MNEC, BMEC)	Dolaşım sistemi, beyin ve omurilik zarları (meninksler)	

### 2.1.1. Enteropatojenik *E.coli* (EPEC)



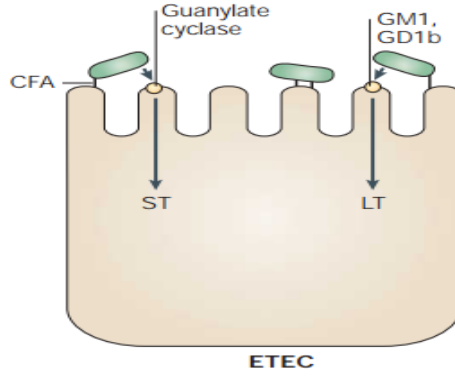
Şekil 2.4 EPEC(Kaynak [24] ‘dan modifiye edilmiştir)

İlk olarak 1955 yılında karakterize edilmiş olan EPEC suşları genellikle 1 yaş altındaki çocuklarda ishale neden olmaktadır. Bu grupta yer alan suşlar genel olarak toksin üretmezler ancak ishale neden olabilmektedirler [29]. Enfektif dozu  $10^8$ - $10^{10}$  kob olan EPEC oral yolla konakçıya ulaşarak kanlı olmayan, mukuslu ve sulu ishale neden olurlar [30]. EPEC enfeksiyonu genellikle sulu ishal, kusma ve ateş semptomları ile gerçekleşir ancak bazı vakalarda kronik enterit şekline uzayabilmektedir. EPEC doğumhanelerde ve kreşlerde gerçekleşen salgınlarla ilişkilendirilse de yetişkinlerde de salgınlar yaygın olarak görülmektedir [14]. Atipik EPEC (aEPEC), tipik EPEC'ten (tEPEC) daha yaygın olarak görülmektedir [15].

Sahip oldukları tutunma faktörü plazmidleri sayesinde bağırsak mukozasına tutunabilirler. İntestinal mukozada kolonize olduktan sonra tutunma-yoketme (attaching and effacing, A/E) lezyonları üretilir. A/E fenomeni EPEC suşlarının en önemli virülans faktörüdür [24]. Tutunma ve yoketme (A/E) lezyonları üretebilmesi EPEC için ayırt edici bir fenotipik özelliktir [25]. A/E geni(*eaeA*), intimini (tutunma-yoketme faktörü) kodlar, bu faktör yardımı ile ciddi lezyonlar oluşarak bağırsak dokusundaki emilim vilusunun yokolmasına dolayısıyla malabsorpsiyona ve ishale neden olurlar [15].

Tipik suşları yalnızca enterosit bozma bölgesi (Locus enterocyte effacement, LEE) ve EPEC tutunma faktörü (EAF) tarafından kodlanan virülans faktörlerini üretirler ve bu anlamda homojen bir virülans gösterirler [30]. Tipik EPEC (tEPEC) plazmidinin ayırt edici karakteristiği oto-aggregasyon tutunma (üst üste tutunma) şeklindedir ve çevresel faktörler değişim gösterdiğinde ayrılma gözlenir. Bunun yanı sıra tipik suşlar atipik EPEC (aEPEC)'ten intimin tipi ile ayrılmaktadır. Atipik EPEC suşları kromozomal patojenite adası olan LEE'e sahiptirler. LEE patojenite adası, A/E lezyonları oluşumu için gerekli olan koşulların sağlanmasını sağlamaktadır [30].

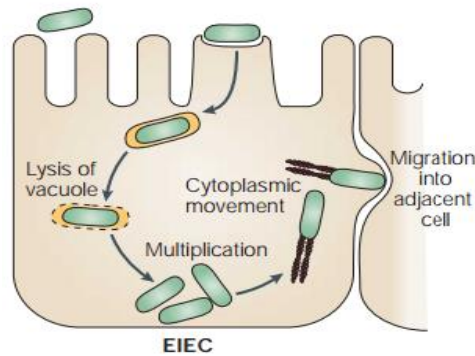
### 2.1.2. Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC)



Şekil 2.5 ETEC(Kaynak [24] 'dan modifiye edilmiştir)

ETEC suşları seyahat ishali (traveler's diarrhea) olarak anılan rahatsızlığın başlıca etmenidir. Sanitasyonun zayıf olduğu gelişmekte olan ülkelerde ishale neden olmaktadır [15]. Yine özellikle tropik iklimlerde enfektif ishale de en yaygın nedeni ETEC olmaktadır. Hastalık sulu ishale eşlik eden karın krampları şeklinde görülmektedir ve ateş düşük seviye de ya da hiç görülmez [14]. Hastalığın gelişebilmesi için, patojenin bağırsakta epitel hücrelere pili veya kolonizasyon faktör antijeni (CFA) ile tutunarak kolonize olması; ardından ısıya duyarlı (LT) veya ısıya dayanıklı (ST) toksinlerinden birini veya ikisini birden üretmesi gerekmektedir [15]. Bu enterotoksinler sodyum emilimini engelleyip klorid salınımını uyararak sulu ishale neden olurlar [19]. Bunların yanı sıra hastalığın oluşabilmesi için yüksek miktarda hücrenin vücuda alınması gerekmektedir ( $10^8$ - $10^9$  kob). Semptomlar 3 saat içerisinde gelişebilmektedir ve koleranın daha hafif bir formunu andırmaktadır. Baş ağrısı, mide bulantısı ve kusma da görülebilir. Çocuklarda sıvı kaybına bağlı ölümler gerçekleşebilmektedir [15].

### 2.1.3. Enteroinvazif *E.coli* (EIEC)



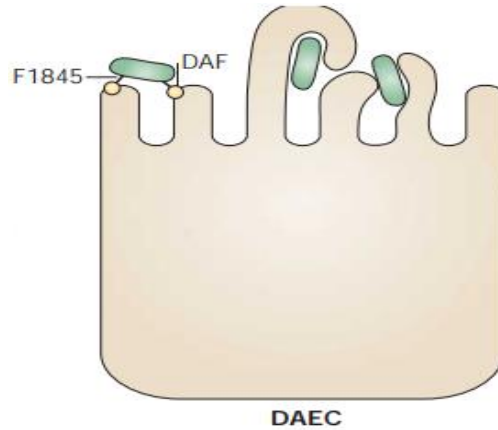
Şekil 2.6 EIEC([24] 'den modifiye edilmiştir)



*Shigella* ve EIEC epitel hücreleri işgal edebilme becerisini kazanarak evrilmiş ve ciddi intestinal rahatsızlıklara yol açabilen enterik patojenlerdir. Bu bakteriler iki ayrı cinsten sınıflandırılmış (*Shigella* ve *Escherichia*) olsalar da moleküler deliller bu sınıflandırmanın doğru olmadığını göstermektedir ve beraberce invazif *E.coli* grubunda değerlendirilmelerinin daha uygun olduğu düşünülmektedir. Bilinen tüm *Shigella* suşları invaziftir ve basil tipi dizanteriye neden olmaktadır, bununla birlikte sadece belli *E.coli* serotipleri (EIEC suşları) aynı beceriye sahiptir [16].

EIEC suşları shigellozis benzeri dizanteriye neden olurlar. Öncelikle epitel hücrelere bağlanırlar ve işgal ederler, buradan hücreden hücreye geçiş yaparak enfeksiyonun bağırsaklarda yayılmasına neden olmaktadır. Hücre hasarı dolayısıyla kanlı, mukuslu bir ishale neden olurlar. Semptomların gelişmesi için  $10^6$  kob kadar hücrenin vücuda alınması gerekebilir. Hastalık semptomları shigellozise benzemektedir. Enfektif dozun vücuda alınmasını takiben karın krampları, şiddetli ishal, baş ağrısı, titreme ve ateş gözlenmektedir. Semptomlar 7-12 gün kadar devam etse de, birey uzunca bir süre taşıyıcı olabilmekte ve patojenin yayılmasına neden olabilmektedir. Yalnızca insanların bu patojenin konakçısı olduğu düşünülmekte ve gıdalara fekal yolla bulaşmaktadır [15]. Enfeksiyonun insandan insana geçişi de söz konusu olabilmektedir [14].

#### 2.1.4. Difuz-aderent *E.coli* (DAEC)

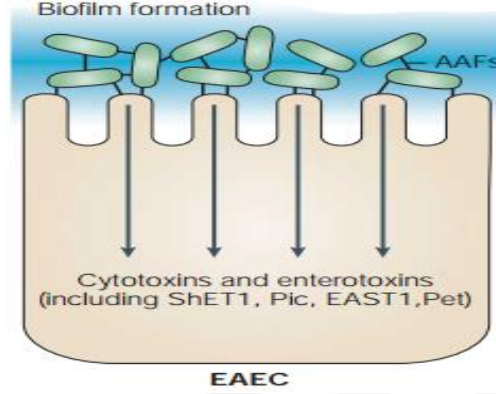


Şekil 2.7 DAEC (Kaynak [24] 'dan modifiye edilmiştir)

DAEC, idrar yolu enfeksiyonuna yol açtığı ve 1-5 yaş arası çocuklarda ishale neden olduğu bilinen bir patojen gruptur. Bununla beraber ishal gelişimindeki rolü hala tartışılmaktadır. Hep-2 hücrelerinin yüzeyindeki parmak-benzeri uzantıları

tahrik ederler. Bu parmak benzeri uzantılar bakteri hücrelerinin etrafını sararak hücre içerisine alınmadan organizmaya koruma sağlanmış olmaktadır [19,25].

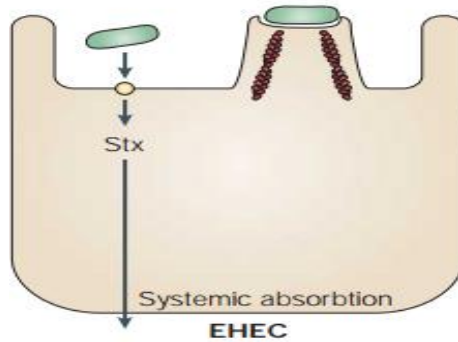
### 2.1.5. Enteroagregatif *E.coli* (EAaggEC, EAEC)



Şekil 2.8 EAEC ([24] 'dan modifiye edilmiştir)

EAEC, gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak çocuklarda ve yetişkinlerde 14 günden uzun sürebilen “inatçı” ishale neden olmaktadır. Çocuklarda görülen ishal ETEC tipi ishale benzemektedir ve hafif seyretse de, önemli mukozal hasara neden olmaktadır. Enfeksiyon sırasında aggregatif tutunma fimbriyası ile hücreler karakteristik tuğla-benzeri topluluklar oluşturmakta ve böylelikle bağırsak hücrelerinin mukozal hasarına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, enteroagregatif ısıya dayanıklı toksin (EAST) ve hemolisin (por oluşumuna neden olur) olarak iki tip toksin üretmektedirler. Genel olarak shiga-toksin (stx) üretmezler. Ancak 2011 yılında ortaya çıkan bir EAEC serotipi olan O104:H4, stx üreterek Almanya'daki en büyük *E.coli* salgınına neden olmuş ve ezber bozmuştur [15].

### 2.1.6. Enterohemorejenik *E.coli* (EHEC)



Şekil 2.9 EHEC ([24] 'dan modifiye edilmiştir)

Bu gruptaki suşlar kanlı ishal (hemorojik kolit) ve hemorajik üremik sendrom (HUS) etmeni olarak, diğer gruplara kıyasla daha yakın zamanlarda (1982) tanımlanmıştır. Bu patotipin en belirgin karakteristiklerinden biri shiga-benzeri toksin (Stx) üretmesidir [15]. Tüm EHEC, shiga-benzeri toksin ürettiğinden aynı zamanda shigatoksijenik veya verotoksijenik *E.coli* (STEC/VTEC) olarak bilinmektedirler [15,31]. Tüm EHEC'ler sitotoksin üretmekte ise de sitotoksin üreten tüm türler EHEC değildir [32, 33]. Bu nedenle EHEC grubu STEC'nin bir alt grubu olarak kabul edilmektedir. EHEC grubunun en bilinen üyesi *E.coli* O157:H7'dir. Bunun yanında O26:H11, O103, O104, O111, ve sorbitolü fermente eden O157-H sero grupları da bu grupta yer alan STEC'lere örnek verilebilir [12].

### **2.1.7. Shigatoksijenik *E.coli* (STEC)**

Shiga-toksin üreten *Escherichia coli* (STEC), dünya çapında birçok salgından sorumlu olan gıda kaynaklı bir patojenik *E.coli* grubudur. Geviş getiren hayvanların bağırsaklarında bulunan STEC fekal yolla gıda ve suyun kontaminasyonuna neden olabilmektedir [1]. STEC grubunda O26, O111, O114 gibi enteropatojenik (EPEC) "O" gruplarının yanı sıra O145, O103, O121 gibi EPEC olmayan sero gruplar da bulunmaktadır [34]. Bu patojenler insanlarda orta ve yüksek şiddette hastalıklara neden olabilmektedir. Bu hastalıklar hemorajik kolit (HC) ve hemolitik üremik sendroma (HUS) kadar ilerleyebilmektedir [2]. STEC enfeksiyonları, hiçbir semptomun gelişmediği hafif rahatsızlıklardan, ölümlü sonuçlanan ağır semptomların geliştiği ciddi enfeksiyonlara kadar geniş bir aralıkta olabilmektedir [35].

Bu patojenlerin bulaşma kaynağı geviş getiren hayvanlar olmakla beraber, özellikle sığırlarla taşınım oranları toplum sağlığını tehdit etmektedir [5]. İnsanlara hastalık geçişleri temelde sığır kaynaklı olmakta ve bu hastalık etmenleri genellikle taşıyıcı hayvanlarda hastalık yapmamaktadır [21]. Özellikle hassas bireylerde  $10^1$ - $10^2$  hücrenin bile hastalık gelişimine neden olabileceği belirtilmektedir [15]. ABD'de çocuklarda akut böbrek yetmezliğinin başlıca sebebi HUS olmaktadır [14]. O157:H7 dışındaki STEC serotiplerine non-O157 STEC'ler denilmektedir [3].

STEC terminolojisi için önerilen bazı sınıflandırmalar bulunmaktadır. Karmali ve ark. (2003), STEC seropatotip sınıflandırması için bir sistem önermiştir. Buna göre STEC suşları rapor edilen salgın sıklığı ve hastalığın şiddetine göre 5 gruba ayrılır (A'dan E'ye). Seropatotip A, O157:H7 ve O157:H- 'dan oluşmaktadır.

Seropatotip B grubunda; O26:H11, O103:H2, O111:H-,O121:H19 ve O145:H- gibi seropatotip A'ya göre daha az sıklıkta salgında rapor edilen suşlar bulunmaktadır. Seropatotip C, sporadik HUS vakalarına neden olmuş ancak salgına neden olmamış suşları içeren; Seropatotip D ve E de ağır hastalık ve salgınlarla ilişkisi olmayan - kendi aralarında "insanlarda hastalık yapan ve yapmayan" olarak ayrılan- gruplardır [4,36]. Girardeau ve ark., yaptıkları çalışmada STEC filogenisi, patojenitesi ve virülans faktörleri arasında bir ilişki olduğunu göstererek STEC sınıflandırmasına katkı sağlamışlardır [37]. Buna göre suşlar temel olarak iki gruba ayrılmış görülmektedir: Filogenetik grup B1 (%70) ve filogenetik grup A (%19). Filogenetik grup A temel olarak, hastalık yapmayan seropatotiplerden *eae* virülans genine sahip olmayan suşları içermektedir [4,37].

2011 yazında Avrupa'da (Almanya kökenli) gerçekleşen *E.coli* salgınına neden olan izolatın Shiga-toksin fajına sahip olduğu ve daha önceleri bu genetik elemente sahip olmayan bir filogenetik grupta yer aldığı belirtilmektedir [26, 38, 39]. Moleküler tanımlamalar dahilinde bu izolat STEC olarak sınıflandırılabilen ancak genom çoğunluğu enteroaggregatif *E.coli* ile benzerlik gösterdiğinden EHEC grubuna alınmamaktadır. Genomik çalışmalardan elde edilen bu bulgular mobil genomik bölgelerin biyolojik işaret (biyomarker) olarak kabul edildiği veya küçük miktarlarda DNA'nın kullanıldığı mevcut tiplendirme şemasının kısıtlayıcılığını ortaya koymaktadır [26].

Shiga-benzeri toksin, *E.coli* izolatlarının lambdoid profajları tarafından kodlanmaktadır [26, 40]. İlk olarak *Shigella dysenteriae*'nin sebep olduğu epidemik bir dizanteri vakasında karakterize edilmiştir [26, 41]. Toksin Afrikan yeşil maymunlarının böbrek hücrelerine (vero hücreleri) olan sitotoksik etkisi dolayısıyla verotoksijenik ismi ile; *Shigella dysenteriae* tip I'in ürettiği toksine olan biyokimyasal benzerliği ve genetik akrabalığı dolayısıyla da shigatoksin (shiga-benzeri toksin) ismi ile de anılmaktadır [19,26].

Shiga-benzeri toksinler temel olarak iki gruba ayrılmaktadır: Stx1 ve Stx2. STEC suşları bu toksinlerden yalnız birini veya ikisini birden üretebilmektedir. Stx2'nin Stx1'den daha kuvvetli olduğu ve patojenezden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Stx bağırsak hücreleri, böbrek hücreleri ve lökositlerdeki spesifik glikolipit alıcılarına bağlanmakta böylelikle protein sentezini bloke ederek hücre

ölümüne neden olmaktadır. EHEC de, EPEC’te olduğu gibi Intimin adı verilen *eaeA* geni ile kodlanan yakın tutunma faktörünü (intimate adhesion factor) üretmektedir. Bunun yanında 60-MDa’luk bir plasmidde ve TIR’de (translocated intimin receptor; Intimin için konakçı hücre alıcısı görevi gören) kodlanan enterohemolisini üretmektedir [15].

En yaygın STEC’lerden *E. coli* O157:H7’nin virülans faktörlerini kodlayan genler hem kromozom hem de plazmidlerde bulunabilmektedir. Kromozom, en önemlileri *st1*, *st2* ve LEE (Locus of enterocyte effacement) genleri olan geniş yelpazede virülans geni taşımaktadır. İki çeşit verotoksin -ST1 ve ST2 (ve varyantları)- *st1*, *st2* genleri ile kodlanır. Bunun yanında LEE konakçı hücrelerine tutunmak, transdüksiyon yollarının sinyallerinin başlatılması ve tutunma-yoketme (A/E) lezyonlarının oluşumundan sorumlu proteinler için gerekli genleri içermektedir [4,42]. Plazmidlerdeki en önemli virülans faktörleri *ehxA* geni (EHEC enterohemolisini kodlar), farklı bağların üretimi için gerekli genler olmaktadır [4,42]. STEC serogrupları O26, O145 ve O165 ‘nın O157 serogrubu kadar yüksek bir virülansa sahip olabileceği belirtilmektedir [4,43].

Kontamine gıdanın tüketiminden sonra bakteri öncelikle bağırsaktaki epitel hücrelere tutunmaktadır. Intimin, yakın tutunmayı kolaylaştırarak mikrovillus üzerinde kaide benzeri bir yapı oluşturur ve karakteristik A/E lezyonu oluşturulur. Bu yolla emilim villusunun yok edilmesi ile emilimin bozulması ve EPEC ile olduğu gibi bir yıkımlanmaya neden olur. Bakteri daha sonra kolon epitel hücrelerine zarar vererek hemorajik kolite neden olan Stx’i üretir. Stx dolaşım sistemine geçerek bağırsaktaki, böbrekteki ve beyindeki küçük kan damarlarının hasar görmesine neden olur. Bu durum HUS ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) oluşumu ile sonuçlanabilmektedir. Semptomlar tüketimden sonra 3 ila 9 gün içinde ortaya çıkar ve genel olarak 4-19 gün sürer. Toksin aynı zamanda kırmızı kan hücrelerinin parçalanmasına neden olarak böbrekteki küçük kan damarlarında tıkanmaya ve bu yolla HUS gelişimine neden olabilmektedir. HUS özellikle çocuklarda ölümcül olabilmektedir. TTP beyinde pıhtı oluşumuna ve dolayısıyla nöbetlere, komaya ve genellikle ölüme neden olmaktadır [15].

2011 yılında Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı başlıca 7 STEC serovarını (O26, O45, O103, O111, O121, O145, ve O157) saflık bozucu (adulterant)

olarak tanımlayarak bu serovarların herhangi birini içeren etlerin insan tüketimi için satılmayacağını açıklamıştır [15]. Son yıllarda birçok non-O157 STEC serogrubu çeşitli hastalanma vakaları ile ilişkilendirilmiştir. Daha özel olarak STEC O26, O45, O103, O111, O121, ve O145 Amerika Birleşik Devletlerinde hastalanma vakaları ile ilişkilendirilen non-O157 serogruplarının %75'ini oluşturmaktadır [36]. USDA bu STEC serogruplarına “top six/ big six” adını vermiştir [5]. Scallan ve ark., A.B.D’de gerçekleşen O157 STEC enfeksiyonlarının yıllık ortalama %68’inin, non-O157 enfeksiyonlarının ise %82’sinin gıda kaynaklı gerçekleştiğini ifade etmiştir. Non-O157 enfeksiyonlarının O157’ye göre STEC enfeksiyonlarının daha büyük bir kısmından sorumlu oldukları tahmin edilmektedir [4,44].

## **2.2. *E.coli* Asit Dayanımı (AR) ve Asit Tolerans Cevabı (ATR)**

STEC serotiplerinin enfektif dozunun düşük olmasına, sahip oldukları asit dayanımı kabiliyetlerinde katkı sağladığı düşünülmektedir.

Patojenlerin enfeksiyona neden olabilmeleri için öncelikle gıda ortamındaki ve konakçı sindirim sistemindeki çeşitli streslere dayanım göstermesi gerekmektedir. Mikrobiyolojik anlamda stres, organizmanın üremesini veya canlılığını olumsuz etkilen herhangi bir faktör veya koşula verilen isimdir. Mikroorganizmalara uygulanan streslerin etki ve sonuçları değişim göstermektedir. Subletal düzeydeki (öldürücü dozun altında) zayıf stres canlılığın kaybedilmesine neden olmazken üremeyi azaltır veya durdurur. Orta düzeyde stres üremeyi durdurarak bir kısım canlılık kayıplarına neden olur. Ekstrem veya ağır stres ise populasyonun çoğunun ölümüne yol açar [12]. Bir organizmanın bir strese dayanıklılığının, bu stresten farklı streslere subletal düzeyde maruz kalması ile artırılması çapraz koruma olarak adlandırılmaktadır [12,45].

Hem patojenik hem de patojenik olmayan *E.coli* subletal çevresel streslere karşı stres cevabı oluşturmaktadır. Bu cevaplar sayesinde çeşitli çevresel koşullara ve işleme koşullarına karşı direnç geliştirilebilmektedir. Stres cevaplarının doğası ve şiddeti patojenik ve apatojenik *E.coli* suşları arasında, hatta patojenik *E.coli* içerisindeki suşlar arasında bile değişim gösterebilmektedir. *E.coli*, sıcak stresi, soğuk stresi, açlık stresi, osmotik stres ve asit stresi gibi streslere karşı cevap geliştirebilmektedir. Bunun yanı sıra bu streslerden herhangi birine maruz kaldığında

çapraz koruma ile diğer streslerden bir veya birkaçına karşı cevap geliştirebilmektedir [46].

İnvazif gıda kaynaklı patojenler mideden geçerken, ince bağırsaktaki geçici kolonizasyonları sırasında ve konakçı hücre fagozomlarında, düşük pH ve/veya organik asitler ile karşı karşıya kalırlar. Patojenler bu ideal olmayan koşullarda hayatta kalmak için düşük pH'ya adapte olabilecekleri mekanizmalar geliştirmişlerdir. Asit tolerans cevabı (ATR: acid tolerance response) adı verilen bu adaptif cevap, orta düzeyde asidik bir ortama kısa süreli maruziyet neticesinde asit toleransının kazanılmasına müsaade etmektedir [47].

Mikroorganizmaların bağırsakta çoğalabilmeleri (kolonize olabilmeleri) için midenin asidik koşullarında hayatta kalabilmesi gerekmektedir ve *E.coli* bu asidik koşullarla baş edebilmek için metotlar geliştirmiş mikroorganizmalara iyi bir örnektir [26]. Gastrointestinal hastalıklara neden olan *E.coli* gibi bakteriler mide asidine hassasiyetlerini azaltan asit tolerans cevabı (ATR) veya asit dayanımı (AR) denilen mekanizmalara sahiptir. Asit stresine dayanabilmek veya tolere edebilmek için bakteriler; hücrenel, enzimatik ve fizyolojik mekanizmalarını kullanarak hücre içi pH'yı muhafaza etmekte ve hücrenel zararı engellemektedirler. Patojenler belirli membran proteinleri üreterek pH'yı tamponlama, proton geçirgenliğini değiştirecek şekilde membran özelliklerini düzenleme ve çeşitli genlerin tetiklenmesi ile bu hücre zararını engelleyebilmektedirler [30].

Asit muamelesi sırasında organik asitlerin varlığı organizmaların ölümünü hızlandırmaktadır [48]. Laktik asit, asetik asit ve hidroklorik asit bakteriyel hücre içi pH'ların düşmesine neden olabilmektedir ancak laktik asit gibi zayıf organik asitlerin daha kuvvetli bir antimikrobiyal mekanizması bulunmaktadır. Hücre dışında yüksüz olan (disosiye olmamış) zayıf asitler hücre membranından difüze olabilmekte ve burada disosiye olabilmektedir. Bu ayrışma hücre içindeki nötral pH (pH 7 civarı) dolayısıyla gerçekleşmektedir. Asit anyonu hücre içersinde birikim gösterir ve yüklendiği için (ayrışma formu) hücre dışına kolaylıkla difüze olamaz ve hücre metabolizması olumsuz etkilenir [4]. Ancak *E.coli* suşları aside dayanım sistemlerinden olan, glutamat dekarboksilaz sistemini kullanarak zayıf organik asitlerin öldürücü etkilerine karşı savunma sağlayabilirler [48,49]. Bunun yanında oksidatif ve arginin dekarboksilaz sistemlerigibi farklı sistemlerde sahiptir [48].

Düşük pH'li ortamlarda hücre populasyonları 2 tipte bulunabilir. İlk grup sitoplazmik pH'sı proteinleri denatüre edecek ölçüde düşmemiş olan, protein sentezi olmaksızın iyileşebilecek olan hücrelerdir. İkinci grupta ise sitoplazmik pH'sındaki düşüş dolayısıyla protein denatürasyonu görülen ve iyileşmek için protein sentezine ihtiyaç duyan hücreler bulunmaktadır. Bir mikroorganizmanın pH toleransını etkileyen birkaç faktör bulunmaktadır. Bu faktörlere örnek olarak rekabetçi floranın oluşturduğu değişimler, organizmanın maruziyet öncesi ısıl işlem veya düşük su aktivitesi gibi faktörlerle zarar görmüş olması gibi faktörler verilebilir [48].

*Escherichia coli*, hücre içi pH'sını oldukça iyi kontrol edebilen bir mikroorganizmadır ve ortam pH'sı düştükçe hücre içi pH'sı sabit kalır [48]. Bir mikroorganizmanın hücre içi pH'sını nötrale yakın olarak koruması aktif ve pasif mekanizmaların kombinasyonu ile gerçekleşmektedir. Pasif sistemde, sitoplazmada bulunan amino asitler, proteinler, poliaminler, polifosfat ve inorganik fosfatın tamponlama kapasitesi sayesinde asit dayanım gerçekleşir. Aktif sistemler ise fizyolojik, metabolik ve proton-tüketen sistemler olarak gruplanabilir [50].

Daha ayrıntılı olarak asidik ortamda hayatta kalma şu şekilde gerçekleşir; Sitoplazmik membranın potansiyelini tersine çevirerek proton akışını yavaşlatmak, metabolik yolları proton üretimini düşürecek şekilde yeniden organize etmek, amin üretiminin artırılarak alkalizasyona neden olmak ve asidin nötrlenmesini sağlamak. Belirli proteinler ve amino asit dekarboksilaz sistemleri (glutamat, arginin ve lizin) suşların asit dayanımına katkı sağlamaktadır [30].

*Escherichia coli*'nin birkaç aside dayanım sistemi mevcuttur. Bu sistemler genel olarak katkı eklenmemiş minimal besin ortamında (asit-tolerans cevabı sistemleri: ATR sistemleri) ve bir çeşit katkı desteğine gereksinim duyarak (asit-dayanım mekanizmalar: AR mekanizmaları) tetiklenebilen ve fonksiyon gösteren sistemler olarak 2 kategoride incelenebilmektedir. *E.coli* için 3 temel AR sistemi tanımlanmıştır [48,49]. Bu sistemler oksidatif, glutamat dekarboksilaz ve arginin dekarboksilaz sistemleridir. Diğer AR sistemleri lizin ve ornitin dekarboksilaz sistemleridir ancak bu sistemlerin *E.coli* asit dayanımındaki rolü tam olarak anlaşılammıştır. Bunların dışında *E.coli*'nin diğer adaptif mekanizmaları şaperon-temelli AR veya ATR'dır [4].



### 2.2.1. Oksidatif Sistem (AR1)

Oksidatif sistem, *E.coli* gibi oksidatif metabolizmaya sahip bakterilerde görülen, hücreleri minimal besin ortamlarında pH 2,5'a kadar koruyabilen bir sistemdir [48]. Bununla beraber bu sistem glukoz içermeyen ortamlarda üreyen hücrelerde görülmektedir [4,48]. Bir başka deyişle bu sistem hücreleri düşük pH'lı minimal ortamlarda aside karşı korumaktadır [4]. Bu sistemin tetiklenmesi için, durağan faz alternatif sigma faktör,  $\sigma^S$  (RpoS), ve global düzenleyici protein CRP (cAMP alıcı protein) gerekmektedir ve sistem glukoz içeren kompleks bir ortamda inhibe olur [4].

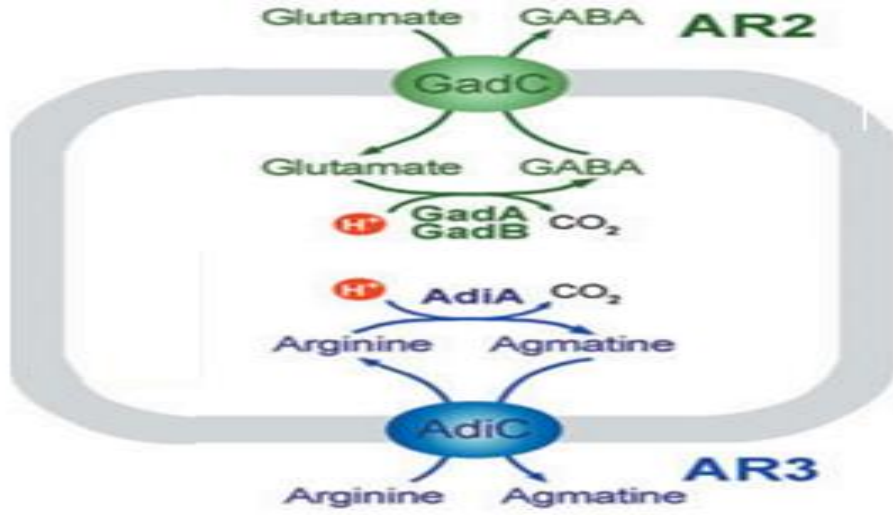
### 2.2.2. Glutamat Dekarboksilaz Sistemi (AR2)

Glutamat dekarboksilaz sistemi hem aerobik ve hem de anaerobik koşullarda indüklenebilir [30]. *GadA* ve *gadB* genleri tarafından kodlanan *gadA* ve *gadB* izoenzimleri tarafından düzenlenen *E.coli* hücrelerinde dominant bir metabolik yoldur. Glutamat varlığına ve glutamat dekarboksilaz genlerinden (*gadA*, *gadB*) en az birinin ekspresyonuna, *gadC* genine, glutamat/ $\gamma$ -aminobütirik asit antiportuna gereksinim göstermektedir. *GadA* izoenzimi hücreler asidik koşullarla karşılaştığında ve *gadB* izoenzimi de hücreler durağan faza geçtiğinde aktif olur. Asit stresini hafifletmek için fazla sitoplazmik protonlar, amino asitlerin dekarboksilasyonunda kullanılır ve bu proses iç pH'nın artması ile sonuçlanır [30]. Proton alımı ile *GadA* veya *GadB* tarafından gerçekleştirilen bu glutamat dekarboksilasyonu sonucunda  $\gamma$ -aminobütirik asit üretilir.  $\gamma$ -aminobütirik asit *GadC* ile hücre dışına aktarılırken glutamat hücre içerisine girer [4].

### 2.2.3. Arginin Dekarboksilaz Sistemi (AR3)

Bu sistem yalnızca anaerobik/fermantatif koşullarda indüklenir. *AdiA* geni tarafından kontrol edilir ve arginin varlığına bağlıdır. Hücreler asidik strese maruz kaldıklarında *adiA* geni, amino asit argininin dekarboksilasyonunu düzenler ve bu proses sonucunda hücre içi pH yükselir [30]. Yine proton alımı ile *AdiA* tarafından gerçekleştirilen arginin dekarboksilasyonu sonucunda agmatin üretilir. Agmatin *AdiC* ile hücre dışına aktarılırken arginin hücre içerisine girer [4]. Arginin ve glutamat dekarboksilasyonu sistemleri sırasıyla arginin ve glutamat varlığına bağlı olarak yine minimal besin ortamında hücreleri pH 2,5'e karşı koruyabilir [43]. Bu iki

sistemde glukoz içeren kompleksbesiyerlerinde üretilmiş hücreler, glutamat veya arginin içeren düşük pH'lı minimal besiyerlerine aktarıldığında hücreleri asidik koşullarda korurlar [4].



Şekil 2.10: *E.coli*'nin Sahip Olduğu AR2 ve AR3 Sistemlerinin Özeti (Şekil [51]'dan modifiye edilmiştir)

#### 2.2.4. Asit Stresine Fizyolojik Adaptasyonlar

*E.coli* membran kompozisyonunu, membran akışkanlığını düşürecek bir şekilde değiştirerek proton geçişini azaltabilmektedir. Bu durum, doymamış yağların konsantrasyonunu azaltan ve siklopropan yağ asitlerinin konsantrasyonunu arttırmayı sağlayan, siklopropan yağ asit fosfolipit sentezi ile gerçekleştirilir. Dahası proton geçişi, membran dışı porinlerinin (OMP) polifosfat veya kadaverin ile bağlanarak bloke edilmesiyle azaltılabilir [50]. Periplazm da bünyesinde HdeA ve HdeB denilen şaperon proteinleri barındırır. Bu proteinler GadE'ye dayalı aside uyum adasının bir parçası olarak kopyalanır [50]. Bu proteinlerin genleri durağan fazda, asidik pH'da tetiklenir [4]. HdeA ve HdeB nötral pH'da dimerik yapıdadır, düşük pH da kısmen açılmış (unfolded) monomerlere çözülerek asit tarafından denature edilen proteinlere bağlanır. pH yükseldikçe HdeA ve HdeB substrat proteinleri serbest bırakırlar. Bu bağlanma ve serbest bırakma döngüsü periplazma proteinleri ATP'ye bağlı sistemlere (ör: GroEL/ES veya DnaK/DnaJ/GrpE sistemler) ulaşamadığından önemli bir adaptasyon olmaktadır [50].

*E.coli*'nin ısı şoku gibi streslere karşı etkin bir şekilde işleyen çok sayıda sitoplazmik şaperon proteini olsa da Hsp31 asit stresi ile ilişkilendirilmiş tek şaperonudur. Homodimerik Hsp31 bir tutucu görevi görür: stres ortadan kalkıncaya dek katlı olmayan ara ürünlere bağlanır ve onları stabilize eder. Daha sonra proteinlerin yeniden, kendiliğinden veya ATP'ye bağlı şaperon sistemler yardımıyla katlanmasına müsaade eder. Protein şaperonlarının dışında DNA'ya bağlanan Dps proteini, DNA'ya bağlanarak onu koruması sayesinde şiddetli asit stresi karşısında hayatta kalmaya katkı sağlar. Dps, Fe<sup>2+</sup> iyonlarını çevreleyerek kafes benzeri bir yapı oluşturur. Böylelikle Fenton reaksiyonu ile zararlı hidroksil serbest radikallerin oluşumunu azaltır [50].

### **2.2.5. *E.coli* Suşlarının Asit Dayanımını Etkileyen Diğer Faktörler**

#### **2.2.5.1. Aerobik Ortam**

Aerobik solunumda oksijen elektron alıcısı olarak davranır böylelikle *E.coli* suşları aerobik solunum zinciri ile membran üzerinden protonların yer değiştirmesi sayesinde enerji elde ederler. Aerobik koşullarda *E.coli* suşları stres koşullarına cevaben redoks düzenleyiciler ve stres proteinleri gibi moleküller üretirler. Düşük pH da üretilen 13 proteinin 2'si aerobik koşullarda aside maruziyette üretilmektedir [30].

#### **2.2.5.2. Anaerobik Ortam**

Anaerobik koşullarda oksijen varlığında eksprese edilen genlerin 3'te biri değişiklik göstermektedir. Oksijen yokluğu metabolizma üzerine olumsuz etki eder; atıkların birikmesine ve fermantasyon ürünlerinin atımının artmasına neden olarak hücreyi strese sokar. Yüksek pH seviyeleri, fermantasyon asitleri ve amonyum üretimi ile fermantasyon prosesini hızlandırır. Dihidroksiaseton (Dha) kinaz sistemi fosfatı şeker ve amino asitlerin katabolik ürünlerine katalizler (dihidroksiaseton). Dha, daha sonra yüksek pH'da indüklenen gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GapA) enzimi ile parçalanır. Yüksek pH'da GaT GABA'yı süksinat ürünlerine (içsel alkalinizasyonu nötralize etmek veya fermantasyon asitlerine dönüştürülmek için üretilen asit) düzenler [30].

### 2.2.5.3. Strese Önceden Maruz Kalma

*E. coli* O157:H7'nin subletal asidik koşullara maruz kalmasının, aside alışma (habütasyon) ile asit toleransını tetiklediğini; takip eden asit stresi ve termal streslere adaptasyonlar geliştirmesine müsaade ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [30].

Gıda ortamı ve işleme koşulları mikroorganizmaları birden çok strese maruz bırakarak strese adaptasyonu destekleyebilir. Çalışmalar *E. coli* O157:H7'nin yavaş düşüş gösteren pH'lı ortamlarda aside adaptasyonunun çapraz korumaya neden olarak, çeşitli gıdalarda ısıl inaktivasyona direnç gösterebilmesine yol açtığını göstermektedir [52].

Dolayısıyla *E. coli* gibi patojenlerin bazı çevresel koşullara daha önceden maruz kalmaları mide asitliğinin bu patojenleri inaktive etmede daha az etkili olmasına neden olabilmektedir [30].

### 2.2.5.4. DNA Tamir Mekanizması

Asit, DNA'nın çift zincirini bozar, böylelikle asit maruziyeti yanlış baz eşlemeleri dolayısıyla hücre ölümü ile sonuçlanır. Asidik ortamların bu etkisini karşılayabilmek için hücrelerin DNA'ya bağlanan proteini olan Dps (DNA –binding protein in starved cells, Dps), DNA ile birleşerek düşük pH'da stabil olan DNA-Dps kompleksini oluşturur. Bu kompleks DNA'yı asidik koşullarda oluşan radikallerden korur. Şaperon benzeri fonksiyon gösteren HdeA proteini, denatüre olmuş periplazmik proteinlerin çökmesini engeller. Bu proteinler asit stresine karşı sitoplazmik proteinlerden daha hassastır [30].

## 2.3. STEC ve Gıda İlişkisi

STEC ile insanlara hastalık geçişleri temel olarak sığır kaynaklı olmakla beraber, bu patojenler keçi, koyun, geyik gibi geniş getiren hayvanlar aracılığıyla da gıda zincirine geçiş yapmaktadırlar [21].

2017 yılında STEC enfeksiyonları 2014-2016'ya kıyasla %28 oranında artış göstermiştir. Bu artışın non-O157 STEC enfeksiyonlarının teşhisindeki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir. Klinik laboratuvarlar uzun yıllardır O157 için testler gerçekleştirebilmektedir. Kültürden bağımsız tanımlama tekniklerinin (culture

independent diagnosing techniques: CIDT) kullanımındaki artış ile genel olarak laboratuvarlar bir türün öncelikle shiga-toksin üretip üretmediğini belirleyip daha sonra O157 için test etmektedirler. O157 için negatif sonuç aldıklarında non-O157 suş veya suşların varlığına kanaat getirebilmektedirler. Daha sonra hangi non-O157 suşu olduğunu belirlemek için uzmanlaşmış başka laboratuvarlara gönderebilmektedirler. CIDT'ler organizmaların üremesine yani kültürlenmesine ihtiyaç duyulmadan uygulanan tanımlama yöntemleridir. Böylelikle bu yöntemler sayesinde çok daha hızlı sonuç elde edilebilmektedir [53].

O157:H7 çiftlikte aylara veya yıllara kadar uzayan sürelerde varlığını sürdürebilmekte ve dahası "süper bulaştırıcı" (super shedders) olarak adlandırılan hayvanlar yüksek miktarlarda hücreyi uzun süre (genellikle 6-12 ay) bağırsaklarında taşıyabilmektedirler.

Hayvanlarda patojen taşıyıcısı olabilecek temel bölgeler, deri ve bağırsak olmaktadır. Etin kontaminasyonu ise kesim, karkas yüzme ve parçalama gibi işlem basamaklarında gerçekleşmektedir [4].

Sığır sindirim sistemi STEC suşlarının hayatta kalması için idealdir ve bu hayvanlar Shiga-toksin reseptörlerine sahip olmadıklarından STEC bu hayvanlarda hastalık yapmamaktadır. Sığırlarda hastalık gelişiminin olmaması STEC'nin tespitini ayrıca zorlaştırmaktadır [35].

Et ürünlerinin yanı sıra STEC enfeksiyonları çeşitli kontaminasyonlar ile başka birçok gıda kanalıyla da gerçekleşebilmektedir. Tablo 2.2'de CDC (Centers for Disease Control: Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezleri)'den elde edilen, 2006-2018 yılları arasında gerçekleşen STEC salgın verileri özetlenmiştir.

Tablo 2.2: CDC Tarafından Raporlanan STECSalgınları [54].

İlişkili Gıda Ürünü/İşletmesi	Suş/Serogrup	Yıl
Marul	O157:H7	2018
Yapraklı Yeşillik	O157:H7	2017
Soya fıstığı Yağı	O157:H7	2017
Sığır Eti Ürünleri	O157:H7	2016
Un	O121 ve O26	2016
Tavuk Salatası	O157:H7	2015
MexicanGrill Restorant	O26	2015
Sığır Kıyması	O157:H7	2014
Çiğ Yonca Filizi (clover sprouts)	O121	2014
Tavuklu Salatalar	O157:H7	2013
Dondurulmuş Gıda Ürünleri	O121	2013
Tüketime Hazır Salata	O157:H7	2013
Bologna Sosisi	O157:H7	2011
Kabuklu Fındık	O157:H7	2011
Doğranmış Marul	O157:H7	2011
Lahana Tohumu (Mısır Kökenli) Almanya Salgını	O104	2011
Peynir	O157:H7	2010
Doğranmış Marul	O145	2010
Sığır Eti	O157:H7	2010
Sığır Eti Ürünleri	O157:H7	2009
Hazır Kurabiye Hamuru	O157:H7	2009
Sığır Kıyması	O157:H7	2008
Pizza	O157:H7	2007
Sığır Köfte	O157:H7	2007
Taze Ispanak	O157:H7	2006
Meksika Yemeği Restoran Zinciri	O157:H7	2006

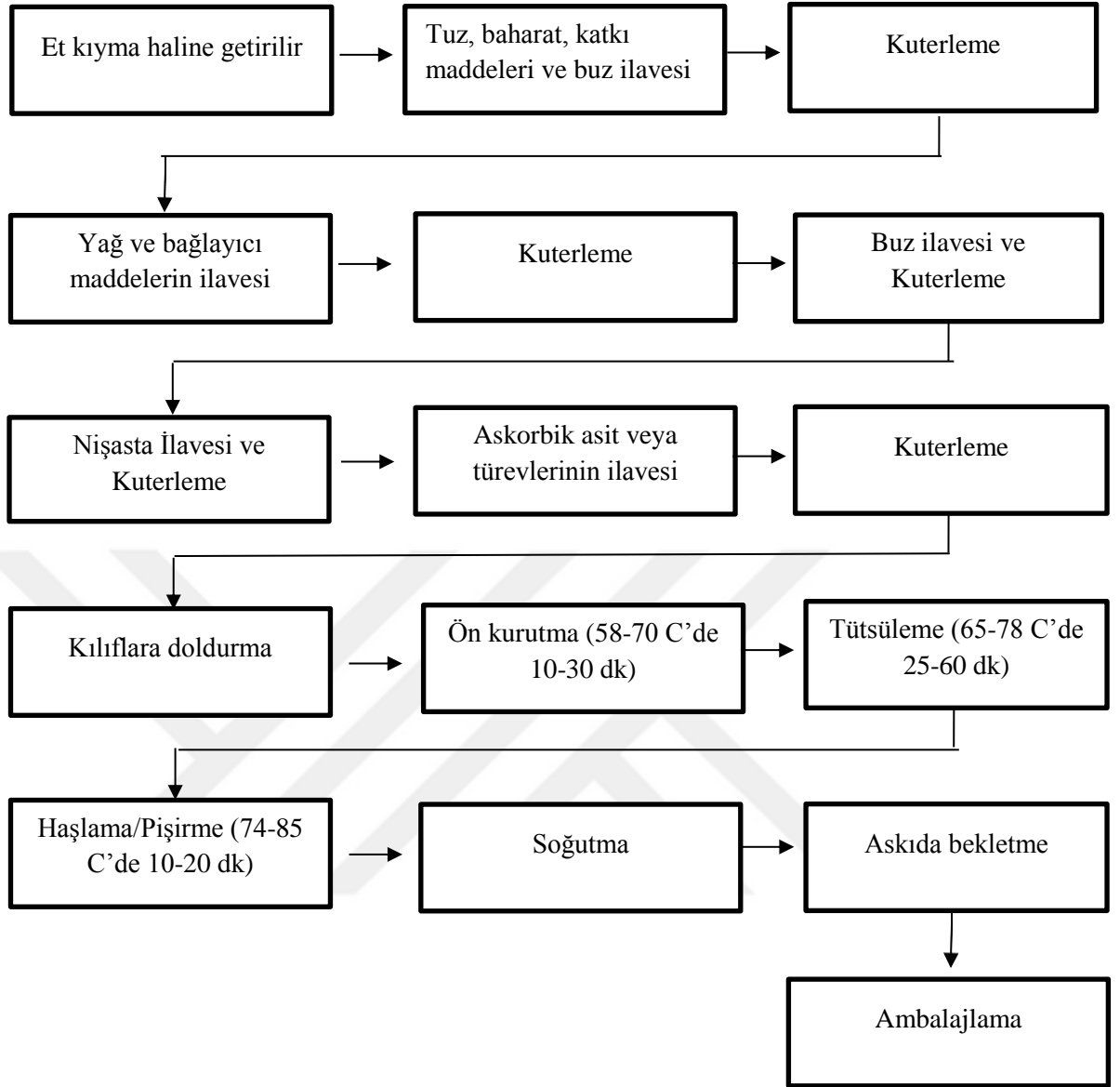
Buzağılarda A/E bağırsak lezyonları ve ishal gelişebildiğini gösteren bir kısım veri olsa da STEC yayıcı sığırların büyük çoğunluğu klinik olarak sağlıklıdır. Hatta *E. coli* 0157:H7 yayıcılığı ile hastalık arasında negatif bir korelasyon bulunduğu belirtilmektedir. Yayıcılık, klinik olarak normal olan

buzağuların %3,7'sinde ishal olan buzağuların ise %0,75'inde tespit edilmiştir. Sığırlarda shiga-toksin hastalık ile ilişkilendirilmemektedir ve shiga-toksin'e bağlı vasküler lezyonlar bu hayvanlarda tespit edilmemiştir [55].

USDA fermente sosisler [17,56] ve tüketime hazır sığır eti ürünlerinde [17,57], *E. coli* O157:H7 için 5-log azaltma standardı belirlemiştir. Buna ek olarak 12 Haziran 2012'de, non-O157 STEC patojenleri ile baş edebilmek için 6 majör non-O157 STEC serogrubu ve *E.coli* O157:H7 için çiğ sığır eti işleme hatlarında rutin doğrulama testlerinin yapılması zorunluluğunu getirmiştir [17,58]. Sığır eti işleyicileri HACCP planlarını yeniden değerlendirerek non-O157 STEC'lerin "bulunması muhtemel" basamakları belirlemeye ve bu basamaklarda patojenlere karşı geçerliliği kabul görmüş müdahaleler yapmaya mecbur kılınmıştır [16,58]. Takiben STEC O157'de olduğu gibi non-O157 STEC'ler de çiğ sığır eti parçalarında saflığı bozan madde (adulterant) olarak değerlendirilmiştir [17,59].

STEC patojenlerinin özellikle et ürünleri ile neden oldukları salgınlar düşünüldüğünde sosis gibi soğuk olarak da tüketilebilen et ürünlerinde bulaşma durumunda patojenlerin yaşam seyri ve asit dayanımlarının izlenmesi önemli görünmektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde de sosislerin STEC bulaşması açısından risk taşıyabilecek ürünler olduğu görülmektedir.

Ülkemizde sosisler, emülsiyon teknolojisi ile elde edilen hamurun yapay veya doğal kılıflara doldurularak kurutma (60°C'de, 10-15 dk), dumanlama (75-78°C'de, 20-25 dk) ve haşlama (85°C'de, 6-10 dk) işlemlerine tabi tutulması ile elde edilen et ürünleridir. Haşlama işlemi sonrasında soğuk duşlama ile sıcaklığı oda sıcaklığına düşürülür. Bu soğutma işleminden sonra kılıf soyma ve ardından ambalajlamaya alınır. Bazı işletmelerde duşlama işleminden sonra kısa süreli ikinci bir dumanlama yapılabilmektedir [60]. Sosis üretimi genel akış şeması Şekil 2.11'de gösterilmektedir.



Şekil 2.11: Sosis Üretim Akış Şeması [6]

Sosislerde kullanılan nitrit kürlenmiş ürünlerde tipik et rengi oluşumunda önemli rol oynayan bir katkı maddesidir. Tat ve lezzete de katkı sağlayan bu katkı maddesi antimikrobiyal ve antioksidan etkiler de göstermektedir [61]. Nitrit üzerine yapılan çalışmalarda anaerobik bakteriler üzerine inhibe edici etkisi olduğu ve *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, ve *Pseudomonas* gibi bakteriler üzerine bakteriyostatik etki gösterdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra araştırmacılar nitritin bakterileri inhibe etme veya öldürme etkisinde pH'nın önemli rol oynadığı düşünülmektedir [62].



Emülsifiye sosislere üretim esnasında uygulanan ısıtma işlemi tüm mikroorganizmaların öldürülmesini sağlamamakta, toplam bakteri yükü  $10^3$  kob/g civarlarına düşürülmektedir [7]. Doğrama, soyma işlemleri gibi aşamalarda işletme ortamından, personelden, ekipmandan bulaşmalar olması söz konusu olabilmektedir [8, 9]. Samaha ve ark., rastgele örneklenen frankfurter sosislerin ve “hot dog” tipi sosislerin sırasıyla %20 ve %24’ünün yasal limitlerin üzerinde mikrobiyal yüke sahip olduklarını, bu ürünlerin sırasıyla %48 ve %32’sinde entero-patojenik *E.coli* bulunduğunu tespit etmişlerdir [10]. Yine bir başka çalışmada yerel üretim ve ithal sosislerin mikrobiyal analizleri yapılmış, yerel üretim sosislerin %40’undan, ithal sosislerin ise %20’sinden *E. coli* izole edilmiştir. Bu sosis gruplarının ikisinde de toplam aerobik bakteri ve koliform bakteri sayılarının limitlerin üzerinde olduğu belirtilmiştir [9]. Bolghari, yaptığı çalışmada, gıda marketlerinden ve fast-foodlardan örnekleme yapılan sosislerin tamamında *E. coli*’ye rastlandığını bildirmiştir [63].

Isıtma işleminin patojenlerin inaktivasyonu için yeterli olmadığı durumlar da mevcuttur. Oteiza ve ark., ısıtma işlemi görmüş Morcilla sosislerinde *E. coli* O26:H11 ve *E. coli* O157:H7 izole etmişler ve sosis üretiminde nişasta ilavesinin termal inaktivasyona karşı mikroorganizmaları koruyucu bir etki gösterdiğini vurgulamışlardır [64]. Her ne kadar Morcilla sosisleri ülkemizde üretilen sosislerden farklı formülasyonda ve proseste üretiliyor olsa da, bu çalışma 90°C’de uygulanan ısıtma işlemi bile sosis ortamında patojenlere rastlanabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca ülkemizde üretilen sosislerin emülsiyon hamurunun (nişasta kullanımı dolayısıyla) da patojenler için koruyucu bir yapı görevi görebileceğini düşündürmektedir.

Sosis ürünleri sadece bulaşma açısından değil aynı zamanda STEC patojenlerinin asit tolerans yanıtlarının geliştirebilecekleri bir ürün olması dolayısıyla da riskli görülmektedir. Enterik patojenlerin hastalık yapabilmesi için insan vücudundaki ilk koruma bariyeri olan mide asidine dayanım göstererek gastro intestinal sisteme geçebilmeleri gerekmektedir [65]. STEC O157’nin enfektif dozunun düşük olmasına, sahip olduğu asit adaptasyon mekanizmasının önemli katkısının olduğu düşünülmektedir [66]. Letal asit içeren ortamlardan (mide) önce zayıf-orta asitli ortamlara maruziyet, *E. coli*’nin asit dayanımını artırması dolayısıyla intestinal sisteme geçişini kolaylaştırmaktadır [67]. Bu şekilde aside adapte olan *E. coli* O157 hücrelerinin, sentetik mide sıvısı ile muamelede, asit şoklanmış hücrelere

göre daha iyi hayatta kaldıkları belirlenmiştir [68]. Non-O157 STEC'lerin de geniş getiren hayvanların gastro-intestinal sistemlerini STEC O157'ye benzer şekilde bir asit adaptasyonu ile kolonize etmekte oldukları belirtilmektedir [69].

Sosislerde depolama boyunca pH' da yavaş bir düşüş gözlenmektedir. Depolama sırasında non-O157 STEC'lerin asit tolerans cevaplarının gelişmesi muhtemel bir risk olarak düşünülebilir. Düşük ölçekli bir stresin uzun zamana yayılmış bir şekilde uygulanması sonucunda bakteriler stres adaptasyonunu sağlayabilir ve böylelikle gıdadaki stres koşullarında hayatta kalabilirler. Waterman ve Small [70], kıyma gibi katı gıdaların yüzeylerinde tutunan aside karşı hassas enterik patojenlerin pH 2,5 gibi yüksek asidik koşulda korunduklarını rapor etmişlerdir [46]. Yapılan bir çalışmada ETEC minimal besiyerinde pH 5,8 ve pH 4,3 'e maruz bırakılmıştır. Takip eden asit uygulamasında (HCl; pH 3,0) pH 5,8'in pH 4,3'e kıyasla hücrelere daha iyi bir asit koruması sağladığı gözlenmiştir [71].

Asit dayanımının düşük sıcaklıklarda daha iyi gerçekleştiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [69,72]. Asit tolerans cevaplarının geliştirilmesinden sonra soğuk depolama sayesinde uzun süre patojen hücreleri bu özelliklerini koruyabilmektedirler [66]. Sosislerin tüketim öncesi soğuktadepolanıyor olması bu patojenlerin asit dayanımlarının daha uzun süre korunabilmesi açısından da risk oluşturabileceği düşünülmektedir.

Literatürdeki laboratuvar besiyerlerinde gerçekleştirilmiş çalışmalar *E.coli* stres cevaplarının ne kadar geniş ve derin olabileceğini göstermektedir. *E.coli*, özellikle STEC, üretim koşullarındaki birçok stres faktörüne karşı direnç geliştirebileceği sistemlere sahiptir. Araştırmalar çoğunlukla, asidik gıdaları da vektör olarak değerlendirebilen STEC O157 üzerine yoğunlaşmış olsa da bazı non-O157 STEC serotiplerinin de en az O157 kadar asit dayanımının gelişmiş olduğunu göstermektedir [69]. Gıda ortamındaki birçok değişken patojenlerin stres cevabını etkileyebildiğinden gıda ortamında çalışmanın daha gerçekçi sonuçlar ortaya koyabileceği düşünülmektedir [46].

Gıdalar çok çeşitli mikroorganizmaların besin maddeleri için yarıştığı kompleks ortamlardır. Bunun sonucu olarak, laboratuvardaki saf kültürlerden farklı olarak gıdaya özgü ve çevresel koşullara adapte olmuş mikrobiyal türlerin hakim olduğu kompleks mikrobiyal ilişkileri barındırmaktadır. Gıdalarda hayatta

kalabilmek sınırlı besin maddesi, uygunsuz pH, oksidasyon, sıcaklık, kimyasallar ve yarışmacı flora vb. birçok stres faktörü varlığında gerçekleşebilmektedir. Bozulma yapan ve patojen mikroorganizmalar gıdalarda yarışma halindedir. Tüm bu açılardan spesifik bir gıdadaki *E.coli* stres cevabı, o gıda ile ilgili tüm mikroekolojik faktörlerin göz önüne alınması ile tahminlenebilir olmaktadır [46].Tüm bunlar ışığında STEC kültürlerini risk teşkil edebilecek bir gıda matrisinde (sosis) incelemek ve bu matrisin asit adaptasyonu ve canlılık gibi faaliyetler üzerindeki etkisini görmek üzere bu çalışma planlanmıştır.

Bu amaçla STEC O157, O26, O103 ve O145'in sosislerde en çok bulaşmanın görüldüğü pişirme sonrası basamaklarda bulaşma senaryosu kapsamında sosis yüzeyine bulaştırılarak, depolama süresince patojenlerin yaşamı ve eş zamanlı olarak sentetik mide sıvısına dayanımları izlenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada perakende satış noktalarından temin edilmiş sosisler (sığırtinden üretilmiş), *E.coli* O157:H7 ve non-O157 STEC serogupları olan *E. coli* O145, O26, O103 ile deneysel olarak kontamine edildi ve 4 °C’de raf ömrü süresince patojenlerin canlılığı ve sentetik mide sıvısı (SMS) içerisindeki asit dirençliliği incelendi. Çalışma esnasında farklı perakende satış noktalarından temin edilen farklı markalardaki sosislerden elde edilen sonuçlarda ciddi ölçüde farklılıklar şekillenince çalışma genişletildi.

Öncelikle çalışma için kullanılacak olan patojen suşların asit dayanım kabiliyetlerinin gıda ortamından bağımsız olarak değerlendirilebilmesi için direk sentetik mide sıvısı (SMS) dayanım testleri gerçekleştirildi (Aşama 1). Daha sonra perakende satış noktalarından temin edilen sosis örneklerinde yaşam ve sentetik mide sıvısında asit yanıtları incelendi (Aşama 2). Bu sosis örneklerinden sonra yerel bir işletmede deneysel üretim yapılarak gıda ortamına (sosis) bağlı farklılıkların daha net olarak ortaya koyulması amaçlandı (Aşama 3).

Sosisler 75 gün depolandı ve analizler depolamanın 0, 15, 30, 45, 60 ve 75. günlerinde gerçekleştirildi.

#### 3.1. Materyal

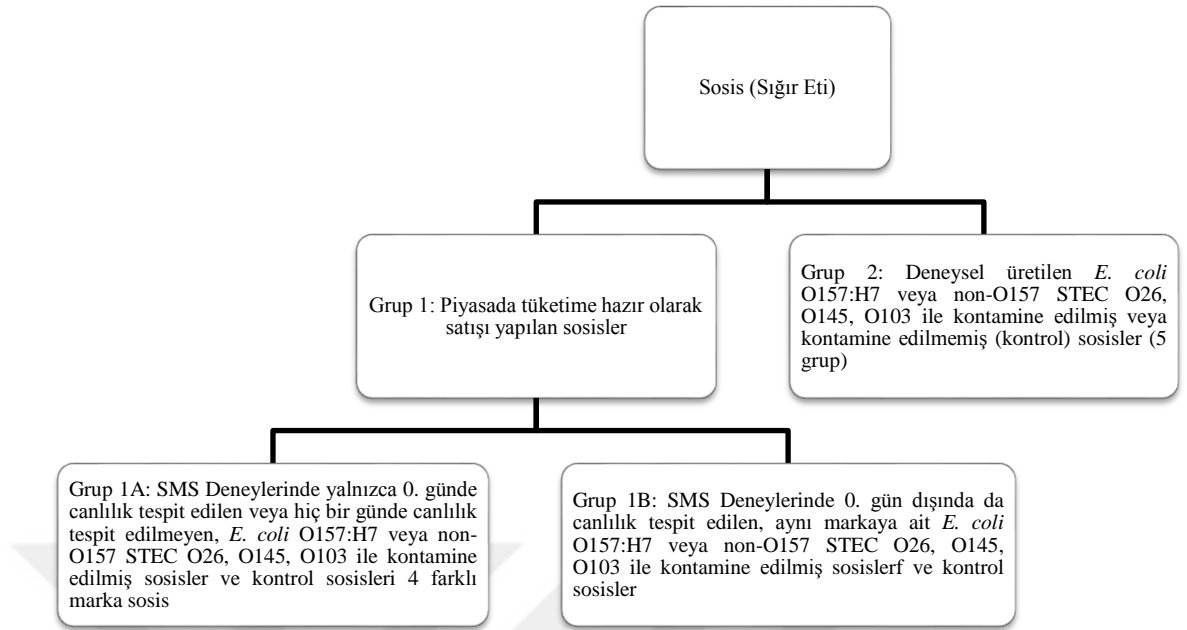
Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında yapıldı ve Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklendi (Proje No: 2017/MF011). Çalışmada sığırtinden yapılan sosisler kullanıldı. Bu amaçla Manisa ve İzmir illerinde bulunan marketlerden en yeni üretilmiş partiden örnekler (aynı parti) toplandı. Örnekler ambalajlı olarak temin edildikten sonra +4°C’de muhafaza edilerek en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı.

Çalışmada kullanılan *E. coli* O157:H7 suşları ATCC 43895 ve ATCC 35157 Amerikan Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection – ATCC) temin edildi. STEC non-O157 serogupları ise *E. coli* O103, O25, O145 Institute Superiore di Sanita’dan (ISS) temin edildi.

Perakende satış noktalarından temin edilen sosisler Grup 1 olarak, yerel işletmede üretimi yapılarak temin edilen sosisler de Grup 2 olarak sınıflandırıldı. STEC patojenlerinin asit dayanımı sonuçlarındaki farklılıkların daha iyi yorumlanabilmesi için Grup 1, analiz sonuçlarına göre Grup 1A ve Grup 1B olarak alt gruplara bölündü. Çalışma sonuçları aşağıda belirtilen deneysel gruplar halinde incelendi (Şekil 3.1).

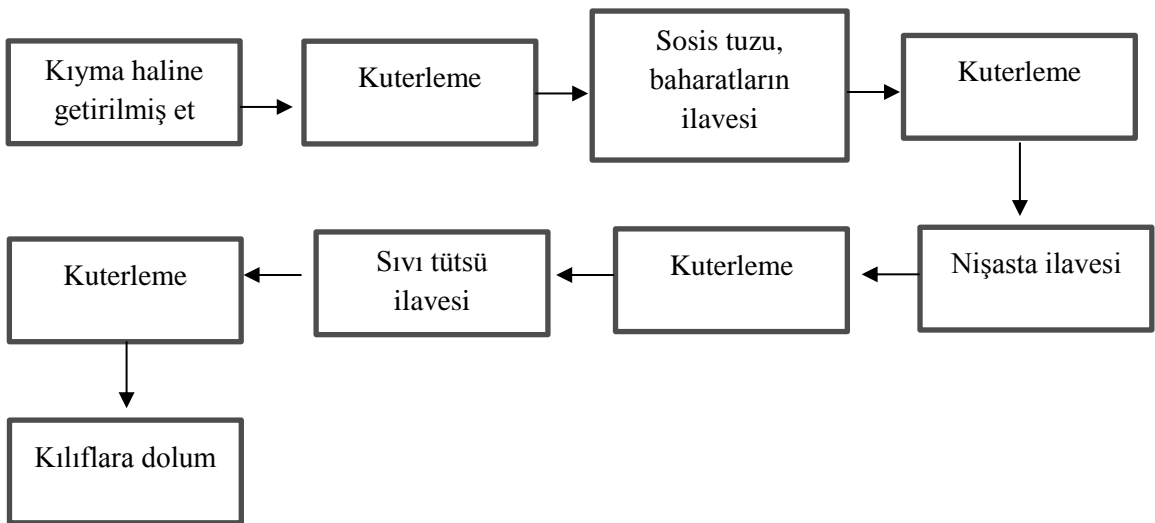
- ◆ Grup 1: Piyasada tüketime hazır olarak satışı yapılan sosisler
  - Grup 1A: SMS Deneplerinde yalnızca 0.günde canlılık tespit edilen veya hiçbir günde canlılık tespit edilemeyen, piyasadan toplanan *E. coli* O157:H7 veya non-O157 STEC O26, O145, O103 ile kontamine edilmiş veya kontamine edilmemiş (kontrol) 4 farklı marka sosis (toplam 20 grup)
  - Grup 1B: SMS Deneplerinde 0.gün dışında da depolamanın diğer günlerinde canlılık tespit edilen aynı markaya ait *E. coli* O157:H7 veya non-O157 STEC O26, O145, O103 ile kontamine edilmiş veya kontamine edilmemiş (kontrol) sosisler (5 grup)
- ◆ Grup 2: Deneysel üretilen *E. coli* O157:H7 veya non-O157 STEC O26, O145, O103 ile kontamine edilmiş veya kontamine edilmemiş (kontrol) sosisler (5 grup)

Perakende satış noktalarından temin edilen sosislere ait verilerden sadece Grup 1A ön denemeler kapsamında yapılmış olup, 1 tekrar halinde yapıldı. Farklı markalara ait olan sosislerde yapılan ve 1 kez tekrar edilen ön denemelerde toplam 7 marka incelendi (7 tekrar). Bunlardan sadece, 75 günlük depolama sonuna kadar takip edilen 4 marka sosisin verileri paylaşıldı. Bu markalar A, B, C ve D olarak adlandırıldı. Grup 1A verileri (ön deneme verileri), patojenlerin asit dayanımlarına etki eden faktörlerin anlamlandırılmasına katkı sağladığı dolayısı ile sonuçlara dahil edildi.



Şekil 3.1. Deneysel Gruplar

Deneysel olarak üretilen sosisler (Grup 2), yerel bir işletmede işletmenin satış yaptığı sosislerin formülüne ve üretim yöntemine uygun olarak üretilerek pişirme ve kılıf soyma basamakları laboratuvarında gerçekleştirildi. Pişirme için, 90°C'lik su içerisine daldırılan sosisler, merkezi nokta 72°C'ye gelinceye kadar haşlandı. Üretim basamakları Şekil 3.2'de özetlenmektedir.



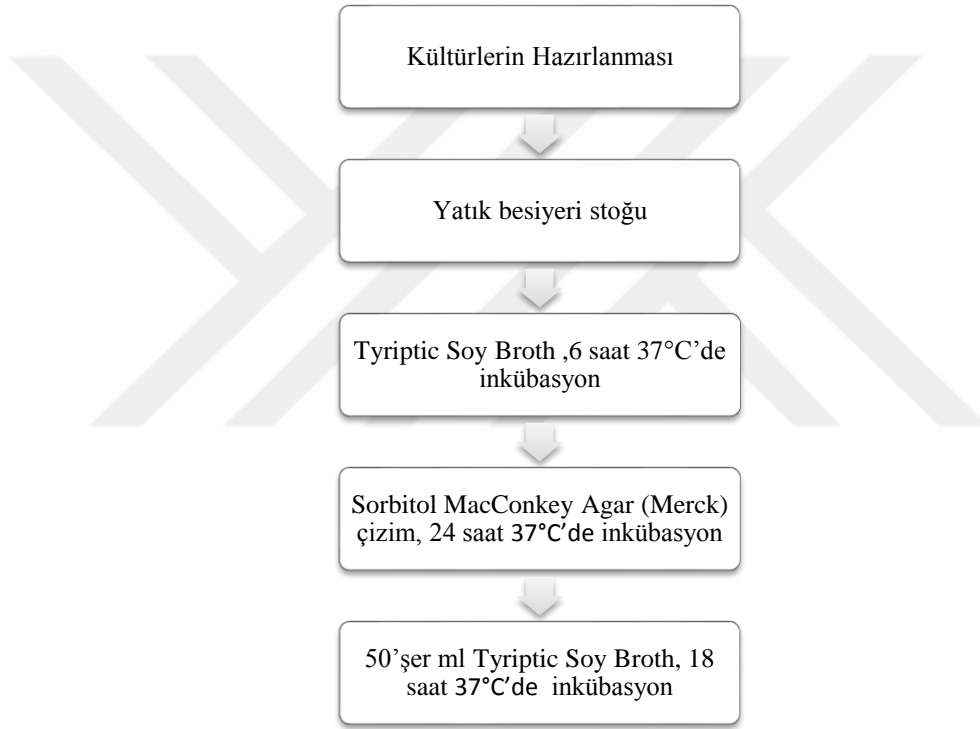
Şekil 3.2. Grup 2 Sosislerin üretimi

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Sosis Yüzeyine Patojenlerin İnokulasyonu

#### 3.2.1.1. Kültürlerin Hazırlanması

Her bir bakteri kültürünün yatık besiyeri stoğundan Tyriptic Soy Broth besiyerine öze ile aktarım gerçekleştirildi. 6 saatlik inkübasyon sonunda Sorbitol MacConkey Agar (Merck) besiyerine çizim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Buradan tek koloni alınarak 50'şer ml'lik Tyriptic Soy Broth besiyerlerine aktarıldı ve yine 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kültürlerin Hazırlanması

#### 3.2.1.2. İnokulumun Hazırlanması

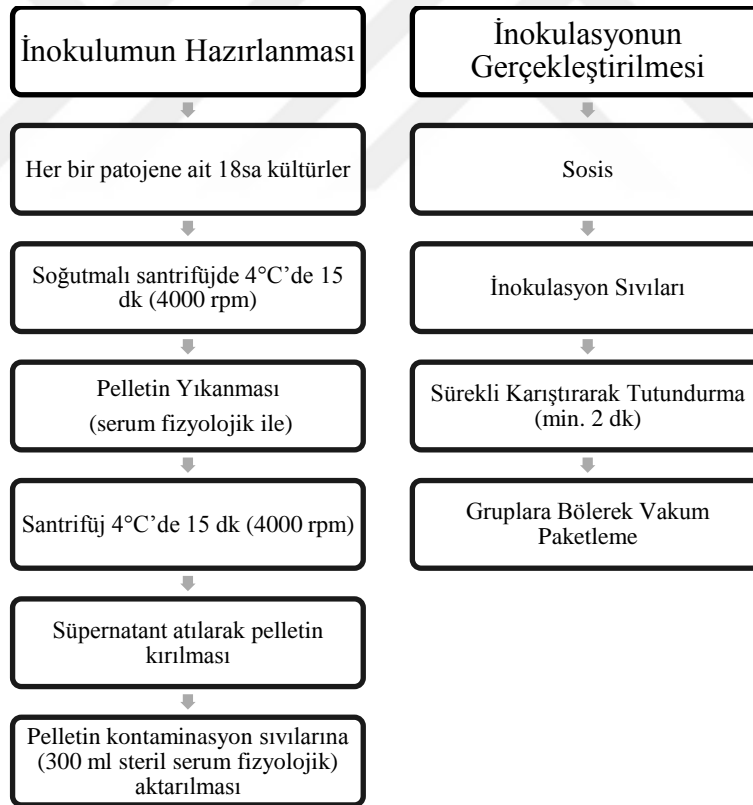
İnokulasyon işlemi ile sosis yüzeyine  $10^5$ - $10^6$  kob/g patojen bakteri tutundurulması hedeflendi. Bu hedefe ulaşabilmek için ön denemeler yapılarak basamaklar belirlendi.

Her bir patojene ait 18 saatlik kültürler, soğutmalı santrifüjde 4°C'de 15 (4000 rpm) dakika santrifüjlendi. Dibe çöken pellet serum fizyolojik ile yıkanarak tekrar santrifüje alınarak ve 4°C'de 15 dk (4000 rpm) santrifüj edildi. Bu işlem

sonunda süpernatant atılarak pellet kırıldı ve tamamı 300 ml steril serum fizyolojik içerisine aktarıldı. Bu karışım inokulasyon sıvısı olarak kullanıldı. STEC O157 için 2 suşun (ATCC 43895, ATCC 35150) eşit miktarda bir karışımı kullanıldı. Bu işlem yine yapılan ön denemeler sonucunda edinilen veriler ışığında şu şekilde gerçekleştirildi; pellet 1'er ml serum fizyolojik ile kırıldıktan sonra her bir karışımdan 0,7 ml alınarak kontaminasyon sıvılarına aktarıldı (Şekil 3.4).

### 3.2.1.3. İnokulasyonun Gerçekleştirilmesi

Hazırlanan inokulasyon sıvılarının içerisine aktarılan sosisler üzerine tutundurma işlemi, minimum 2 dakika süresince sürekli karıştırma ile gerçekleştirildi. Buradan çıkarılan sosisler steril kurutma kağıtlarının (Whatman No:3) üzerine aktarılarak yüzeydeki fazla sıvının uzaklaşması sağlandı. Daha sonra sosisler gruplara bölünerek ambalajlara aktarıldı ve vakum ambalaj cihazında paketlenildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İnokulumun Hazırlanması ve İnokulasyonun Gerçekleştirilmesi



### 3.2.2. Mikrobiyolojik Analizler

Aseptik şartlar altında her paketten 2'şer adet 25gram örnek alınarak, her örnek 225 ml steril peptonlu su (%0,1) içerisine aktarıldı ve 2 dakika karıştırıcıda (Stomacher 400, Fransa) homojenize edildikten sonra desimal dilüsyonları hazırlanarak plaklara çift seri ekim yapıldı. Psikrofil bakteri sayımı, maya sayımı, toplam mezofil aerob bakteri sayımı kontaminasyon öncesi sosislerde ve kontrol gruplarında depolama boyunca gerçekleştirildi. Koliform bakteri sayımı depolamanın başında kontrol gruplarında yapıldı.

**3.2.2.1. Toplam Mezofil Aerob Bakteri Sayımı:** Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyerinde, 35°C 'de 48 saat inkübasyon sonucunda sayıldı [73].

**3.2.2.2. Psikrofil Bakteri Sayımı:** PCA (Merck) besiyerinde 7 °C'de 7 gün inkübasyon sonucunda sayıldı [73].

**3.2.2.3. Maya Sayımı:** DRBC Agar (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar, Merck) besiyeri kullanarak 25°C 'de 5 gün inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayıldı [74]. Mayalar ve küfler koloni morfolojisine göre ayırt edildi.

**3.2.2.4. Koliform Bakteri Sayımı:** VRBA (Merck) besiyerine çift tabaka dökme plak ekim yapılarak petriyer 35°C 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı [75].

**3.2.2.5. Laktik Asit Bakteri Sayımı:** MRS Agar (De Man, Rogosa, Sharpe Agar, LabM) besiyeri kullanılarak yine çift tabaka dökme plak yöntemi ile ekim yapıldı, 35°C'de 72 saat inkübasyon sonrası oluşan kremi beyaz opak renkli bakteri kolonilerinin sayımı alındı [76].

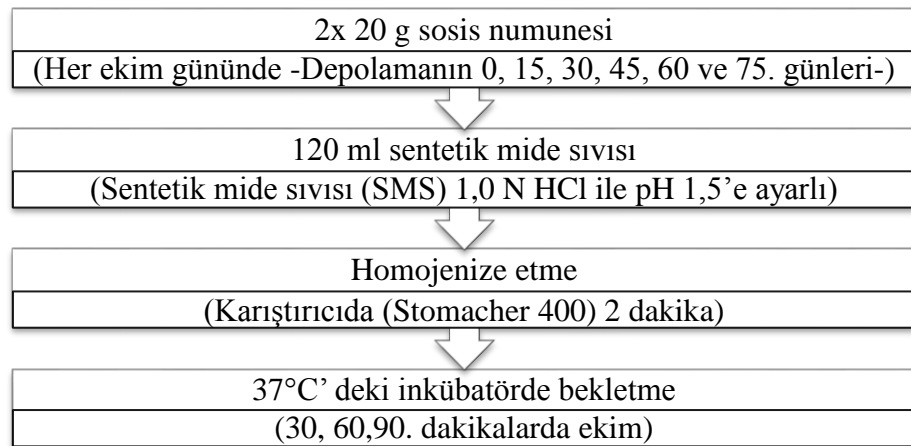
**3.2.2.6. E.coli O157 ve Non-O157 STEC Sayımı:** Her analiz gününde ve sentetik mide sıvısı deneylerinin 0, 30, 60 ve 90. dakikasında gerçekleştirildi. Bu amaçla, SMAC (Sorbitol MacConkey Agar) besiyeri kullanılarak yayma plak yöntemi ile ekim yapıldı 35°C' de 24 saat inkübasyondan sonra oluşan, serogruba göre (renksiz veya pembe renkli) kolonilerin sayımlar alındı [77]. Sentetik mide sıvısı deneyleri sayımlarında 24 saatte üreme gözlenmeyen petriyer ikinci bir 24 saat daha inkübe edildi.

### 3.2.3. Sentetik Mide Sıvısında Asit Dayanımı Testleri

Sentetik mide sıvısı (SMS), Beumer ve ark. Tarafından [78] tanımlandığı şekilde hazırlandı. Kısaca, 8,3 g proteose peptone (E. Merck, Darmstadt, Germany), 3,5 g d-glucose(dextrose, anhydrous) (LABM, Lancashire, UK), 2,05 g sodyum klorid (E. Merck, Darmstadt, Germany), 0,6 g potasyum fosfat (monobazik, anhydrous) (E. Merck, Darmstadt, Germany), 0,11 g kalsiyum klorid (dehydrate) (E. Merck, Darmstadt, Germany), 0,37 g potasyum klorid (E. Merck, Darmstadt, Germany), 0,1 glizozim (yumurta akı orijinli, kristalize) (Fluka, D-89552 Steinheim, Germany), 50 mg safra tuzu (sığır orijinli) (Fluka, D-89552 Steinheim, Germany), ve 13,3mg pepsin (Pepsin A, domuz orijinli) (Sigma, D-89552 Steinheim, Germany) 1litre distile suda çözündürülerek 1,0N HCl (E. Merck, Darmstadt, Germany) ile pH 1,5'e ayarlandı.

Patojenlerin asit dayanımının incelendiği direk SMS dayanım analizleri için 18 saatlik kültürler 1:99 oranında SMS içerisine aktarıldı. Daha sonra 37°C' deki etüvde bekletilerek 30, 60 ve 90. dakikalarda ekim yapıldı.

Sosis yüzeyindeki patojenlerin SMS dayanımının incelendiği analizlerde her ekim gününde 2x20 g sosis numunesi alınıp her biri 120 ml sentetik mide sıvısı (HCl ile pH 1,5'e ayarlı) eklenip karıştırıcıda (Stomacher 400) 2 dakika homojenize edildikten sonra 37°C' deki etüvde bekletilerek 30, 60 ve 90. dakikalarda ekim yapıldı (Şekil 3.5).SMS miktarı, 90 dakikalık maruziyet sonunda hedeflenen pH değeri olan 2,5'in aşılmaması için, gerekli ön denemeler ile belirlendi.



Şekil 3.5. Sentetik Mide Sıvısı Dayanım Analizleri

SMS, 0. dakika sayımları için 2x25 gr sosis 225ml peptonlu su ile homojenize edildikten sonra desimal dilüsyonlar hazırlanarak ekim yapıldı.

Ön denemeler sırasında sosisin formülasyonu gereği SMS'nin pH'sını ciddi oranda tamponladığı ve pH'nın hedeflenen pH'nın üzerine çıktığı tespit edildi. Eklenen SMS miktarı ayarlanarak tüm SMS deneylerinde pH'nın 2,5'in altında kalmasını sağlandı. Asit deneylerinde, sosis üzerine sentetik mide sıvısı eklendikten sonra meydana gelen pH değişimi her ekim aşamasında takip edildi ve pH'nın 2,5' in üzerine çıkmaması hedeflendi. Deneylerde 90 dakikalık maruziyet sonunda pH'nın 2,5'in üzerine çıktığı tespit edilen deneyler iptal edilerek tekrarlandı.

#### **3.2.4. Fizikokimyasal Analizler**

Kimyasal analizler (pH analizi hariç) depolamanın 0. gününde 2 paralelli olarak yapıldı. pH ve % asitlik analizleri ise asit deneylerinin günlerinde (depolamanın 0., 15., 30., 45., 60.,75. gününde) düzenli olarak yapıldı. Nem, yağ, protein ve tuz analizleri yalnızca materyalde (sosis), kontaminasyon öncesinde yapıldı.

##### **3.2.4.1. Nem Tayini**

Sabit tartıma getirilmiş kurutma kabına 5 g parçalanmış sosis tartıldı. Etüvde 125°C 'de 2 saat nemi uçurulduktan sonra desikatöre alınarak soğutuldu. Daha sonra tartımı alınarak aşağıdaki eşitlikten hesaplama yapıldı [79].

Hesaplama: %nem= [(M2-M1) /m]x100

M1: Örnek ve kabın kurutma öncesi ağırlığı (g)

M2: Örnek ve kabın kurutma sonrası ağırlığı (g)

m: Örnek miktarı (g)

##### **3.2.4.2. Protein Tayini**

Kjheldal Metodu kullanılarak yapıldı. Kısaca sülfürik asit ve katalizör karışımı ile berrak yeşil renk oluşuncaya kadar yakma işlemi yapıldı. Sonrasında damıtma yapıldı. Damıtmadan sonra ise 0,1 N HCl ile titrasyon yapılarak hesaplama yapıldı. Laboratuvarımızda mevcut olan protein yakma ve destilasyon cihazları ile analiz gerçekleştirildi [79].

### 3.2.4.3. Yağ Tayini

Soğuk ekstraksiyon ile kloroform-metanol yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. 10g örnek üzerine 2:1 oranında kloroform:metanol karışımı eklenerek homejenizatörde parçalandı. Elde edilen karışım süzüldü, daha sonra süzüntüden çözücünün uzaklaştırılması için evaporatöre bağlandı. Son olarak tekrar 105°C’de sabit tartıma getirildikten sonra desikatörde soğutulularak tartım alındı. Aşağıdaki eşitlikten hesaplama yapıldı [79].

Hesaplama: %yağ miktarı =  $[(M2-M1)/m] \times 100$

m: örnek miktarı (g)

M2: balon+yağ (son tartım)

M1: balon darası

### 3.2.4.4. Tuz Tayini

10 g sosis 100 ml saf su ile parçalanarak bir behere alındı. Karışım kaynatıldıktan sonra süzüldü. Soğuduktan sonra üzerine 2ml %5’lik potasyum kromat eklenerek 0,1 N AgNO<sub>3</sub> ile titre edildi [80].

Hesaplama: % tuz =  $(S \times N \times 0,0585 \times 100) / m$

S: Titrasyonda harcanan AgNO<sub>3</sub> miktarı –Kör denemede harcanan AgNO<sub>3</sub> miktarı

N: AgNO<sub>3</sub> normalitesi

m: Örnek ağırlığı

### 3.2.4.5. pH Ölçümü

Her analiz gününde kontrol grubunda ve ayrıca SMS deneylerinde son pH ölçümleri yapıldı. Kontrol grubunda pH ölçümü için 10 g sosis 90ml saf su ile iyice homojenize edilip pH metre ile ölçüm alındı. SMS deneylerinde pH kontrolü ise yine pH metre yardımı ile gerçekleştirildi.

### 3.2.5. İstatistiksel Analiz

SMS deneylerinde ve diğer mikrobiyolojik analizler sonucunda elde edilen bakteri sayıları log kob/g veya log kob/ml’ye çevrilerek istatistiksel analizler yapıldı.

Her patojene ait veriler tekerrür x serogrup x örnek sayısı x zaman (gün ve dakika) modeline uygun olarak ANOVA testine tabi tutularak değişkenler arası interaksyonlar hesaplandı. Ortalamalar, istatistiksel önem seviyesi %5 olarak kabul edilerek General Linear Models (GLM) prosedürlerine göre Fisher'in en küçük kareler metodu kullanılarak ayrıştırıldı. Verilerin analizi, Statistical Analysis System (SAS) kullanılarak yapıldı [81].



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında sosis matrisinde bazı Shigatoksijenik *E.coli* serogruplarının yaşamı ve sentetik mide sıvısında canlılıkları incelendi. Bu amaçla perakende satış noktalarından temin edilen çeşitli marka sosislere bulaştırılarak, patojenlerin asit dayanımları ve canlılıkları izlendi. Perakende satış noktalarından temin edilen sosislere, sentetik mide sıvısı analizlerinde canlılıkların varyasyon gösterdiği tespit edildi (Grup 1A). Ön denemeler kapsamında gerçekleştirilen bu analizlerin sonuçları Grup 1A olarak yorumlandı. Daha sonra SMS deneylerinde depolamanın ilerleyen günlerinde de canlılık tespit edilen bir marka sosis ile ileri denemeler yapılarak 3 tekerrür halinde sonuçlar raporlandı (Grup 1B). Ardından SMS dayanımındaki varyasyonların daha iyi anlamlandırılabilmesi için deneysel olarak yerel bir işletmede üretim yapıldı ve denemeler gerçekleştirildi (Grup 2). Burada üretilen sosiler üreticinin satışa sunduğu şekilde üretilerek ısı işlemleri ve kılıf soyma işlemleri tarafımızca gerçekleştirildi (merkezi nokta 72°C).

Sonuçlar analizi yapılan örneklerle ve bakterilerin SMS canlılıklarına göre sınıflandırıldı ve bu şekilde oluşturulan gruplar halinde istatistiksel analizler yapıldı. Sınıflandırmalar şu şekildedir;

- ◆ Grup 1: Perakende satış noktalarından temin edilen, tüketime hazır olarak satışı yapılan sosiler
  - Grup 1A: SMS deneylerinde 0. gün haricinde depolamanın ilerleyen günlerinde canlılık tespit edilmeyen perakende satış noktalarından temin edilmiş 4 farklı marka sosis
  - Grup 1B: SMS deneylerinde depolamanın ilerleyen günlerinde de canlılık tespit edilen aynı markaya ait sosiler
- ◆ Grup 2: Deneysel üretilmiş sosiler

Yukarıda belirtilen grupların dışında STEC serogruplarının ayrıca herhangi bir sosis matrisi dışında, direkt SMS sıvısı içerisinde asit dayanımları da incelendi.

#### 4.1. Sosis Örneklerinin Bazı Kimyasal Özellikleri

Sosis örneklerinin bazı kimyasal özelliklerini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen analizlerin sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.1: Sosis Örneklerinin Bazı Kimyasal Analiz Sonuçları

		Kimyasal Özellikler			
		Nem(%)	Yağ(%)	Protein(%)	Tuz (%)
Grup 1A (Markalar)	A	60,58±0,55	10,05±1,34	10,88±0,02	2,23±0,08
	B	64,13±1,19	10,22±0,34	9,77±0,26	2,41±0,10
	C	60,62±0,05	12,52±1,67	9,51±0,07	2,78±0,24
	D	68,68±0,26	12,35±0,84	12,58±0,27	2,34±0,12
Grup 1B		60,98±2,59	10,70±1,42	11,62±0,74	2,44±0,14
Grup 2		57,61±1,62	14,84±0,58	14,96±0,24	1,85±0,04

Sosis örneklerinde Grup 1A sosislerin nem, yağ, protein ve tuz içerikleri sırasıyla 60,58-68,68;10,05-12,52; 9,51-12,58; 2,23-2,78 arasında olduğu bulundu. Grup 1B sosislerin nem, yağ, protein ve tuz içeriklerinin sırasıyla 60,98; 10,70; 11,62 ve 2,44 olduğu tespit edildi. Grup 2 sosislerin ise nem, yağ, protein ve tuz içerikleri sırasıyla 57,61; 14,84; 14,96 ve 1,85 olduğu bulundu.

#### 4.2. STEC Serogruplarının Sentetik Mide Sıvısı İçerisindeki Canlılıkları

STEC serogruplarının asit dayanımlarının gıda matrisinden ayrı olarak ortaya koyulabilmesi için direk sentetik mide sıvısında canlılıklarına bakıldı. Sonuçlar Tablo 4.2’de ve Şekil 4.1’de görülmektedir.

Tablo 4.2. STEC Serogruplarının Sentetik Mide Sıvısında (pH 1,5) Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimler (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,95)

Serogrup	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
O103	9,08±0,77 <sup>ax</sup>	7,21±0,79 <sup>bz</sup>	7,22±0,94 <sup>by</sup>	6,91±0,84 <sup>bz</sup>
O26	9,25±0,94 <sup>ax</sup>	8,19±1,08 <sup>bxy</sup>	8,17±1,44 <sup>bx</sup>	7,65±1,21 <sup>by</sup>
O145	9,40±0,76 <sup>ax</sup>	8,80±1,11 <sup>abx</sup>	8,50±1,17 <sup>bx</sup>	8,29±1,44 <sup>bx</sup>
O157	9,31±0,89 <sup>ax</sup>	7,94±1,28 <sup>by</sup>	7,37±1,14 <sup>bcy</sup>	7,00±1,09 <sup>cz</sup>

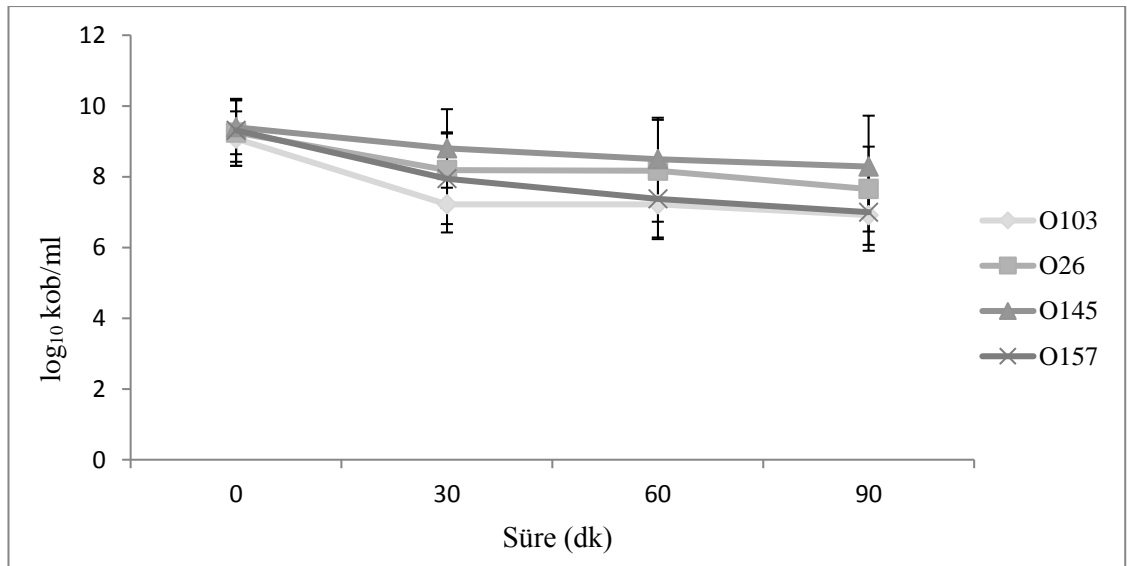
<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)

SMS dayanımları değerlendirildiğinde, tüm patojenlerin sayılarında 30. dakikada önemli bir düşüş saptandığı görülmektedir ( $p<0,05$ ). Daha sonraki analiz dakikalarında canlı bakteri sayılarında, STEC O157 dışında önemli düşüş tespit edilmedi ( $p>0,05$ ). STEC O157 için 90. dakikada yeniden önemli bir canlılık kaybı tespit edildi ( $p<0,05$ ). Patojen sayılarının ilk 30 dakikalık asit şokunda zayıfladığı takip eden 30 dakikada bu strese alıştıkları ancak O157'nin daha fazla maruziyette yeniden hassasiyetinin arttığı düşünülmektedir.

90 dakikalık SMS maruziyetinin sonunda sayıda en az azalma O145'te görülürken (1,11 log), en fazla azalma ise O157'de görüldü (2,31 log). SMS'na giriş sayıları istatistiksel olarak benzer olan patojenlerin 90. dakika sonundaki istatistiki sıralaması O145>O26>O103,O157 şeklinde oldu. Patojenlerin SMS içerisinde önemli sayıda canlılıklarını sürdürmelerinin, sahip oldukları asit dirençlilik kabiliyetlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

*E.coli*, bulunduğu ortam koşullarına göre farklı asit dayanımı sistemlerine gerek duymaktadır. Örneğin Price ve ark. [82] *E.coli* O157:H7'nin elma sirkesinde hayatta kalabilmesi için sigma faktöre dayalı asit dayanımı sistemlerinin daha önemli olduğunu ancak sığır gastrointestinal sisteminde hayatta kalabilmek için sigma faktörden bağımsız asit dayanım sistemlerine ihtiyaç duyduğunu raporlamışlardır.



Şekil 4.1. STEC Serogruplarının Sentetik Mide Sıvısında (pH 1,5) Canlılıklarında Meydana Gelen Değişimler



STEC O157 ve non-O157 STEC'lerin asidik koşullarda hayatta kalma kabiliyetlerinin incelendiği çalışmaların sonuçları değişiklik göstermektedir [83,84,85]. Bergholz ve Whittam (2007) *E.coli* O157:H7'nin non-O157'lere göre daha yüksek asit dayanımı olduğunu tespit etmişlerdir [67]. Ancak bu farkın suşların daha uzun süre istasyonier fazda tutulması ile azaldığını belirtmişlerdir. Bu bulgunun *E.coli* O157:H7'nin asit dayanımının hızlıca istasyonier fazın başlarında gerekleşiior olmasına işaret edebileceği düşünülmektedir [83]. Öte yandan Molina ve ark., belirli asidik koşullarda bazı STEC serotiplerinin stres dayanımlarının O157:H7'den daha fazla olduğunu saptamışlardır [84]. Bu tez çalışmasında da STEC non-O157 suşları SMS dayanımları O157:H7'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Benjamin ve Datta, ATCC 43895 *E.coli* O157:H7 suşunun diğer O157:H7 ve non-O157 suşlarına göre asit dayanımının daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Yine bu çalışmada da araştırmacılar O157:H7 suşları asit dayanımlarının varyasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir [86].

Genel olarak non-O157 STEC'lerin O157'ye benzer mekanizmalar ile asit stresine dayanım gösterdikleri düşünülse de asit dayanım sistemlerinin farklı olabileceğini gösteren çalışmalar da vardır. Yapılan bir çalışmada non-O157 STEC suşları asit stresi ile mücadele etmek için şaperon-temelli asit stres cevabından (HdeA ve HdeB) yararlanabiliyorken *E.coli* O157:H7'de bu sistemin bulunmadığı belirtilmiştir. Carter ve ark., *E.coli* O157:H7'nin non-O157'lerin aksine şaperon proteinleri HdeA ve HdeB'ye dayalı olmayan asit dayanımı sistemleri geliştirmiş olabileceklerini belirtmişlerdir [87]. Large ve ark., *E.coli* O157:H7 ile non-O157 suşlarının (O26:H11, O111:H8, O121:H19) oksidatif, glutamat ve arjinin dekarboksilaz asit dayanım sistemlerini asitlendirilmiş minimal besiyerlerinde incelemiş O157'nin non-O157'lere göre olağanüstü bir asit dayanımının olmadığını tespit etmişlerdir [88]. Bununla beraber O157:H7'nin doğal sistemlerde birden çok mekanizmayı kombine olarak kullanıyor olabileceğini veya kendisini doğal ortamlarda aside daha dirençli kılabilecek alternatif mekanizmalar geliştirmiş olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Berry ve ark., *E.coli* O157:H7 suşu ve 20 non-O157 suşu üzerinde yaptıkları çalışmada hücreleri glukoz (%1) eklenmiş ve eklenmemiş TSB besiyerinde 18 saat inkübe etmişlerdir [89]. Inkübasyon sonunda glukoz içerikli besiyerlerinde pH ortalama 4,3-5,0 iken glukoz içermeyen besiyerlerinde 6,2-6,9 olarak belirtilmiştir.

Kültürler daha sonra HCl ile asitlendirilmiş (pH 2,5) BHI broth besiyerinde 6 saat inkübe edilmiştir. % 1 glukoz içerikli besiyerinde gelişen O157 ve non-O157 bakterilerin takip eden asit stresine daha dayanıklı olduklarını tespit etmişlerdir. Ancak doğada bu tip ortamların bulunma ihtimalinin çok düşük olmasından dolayı genellikle çalışmaların spesifik gıda matrislerinde yapılmasının sonuçların gerçeği yansıtması açısından daha doğru bir strateji olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında yapılan SMS dayanım deneylerinde STEC O157:H7'nin non-O157 serogruplarına göre daha düşük dayanım gösterdiği tespit edildi. Buchanan ve Bagi, asit dayanımı çeşitli izolatlar arasında suş, asidülant tipi ve farklı pH'lardaki asit dayanımının induksiyonuna bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir [90]. Asit dayanımlarının birçok faktörden etkileniyor olması dolayısı ile bu çalışmada öncelikle kullanacak olan suşların gıda ortamı dışında SMS'da canlılıklarına bakıldı. Suşların SMS dayanımlarının çalışmada kullanılacak kültür hazırlama yöntemi ve asidülant tipi (SMS) ile ortaya koyulması amaçlandı.

### **4.3. Sosis Örneklerinde Depolama Süresince Meydana Gelen Mikrobiyal Değişimler**

#### **4.3.1. Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Patojenlerin ve Rekabetçi Floranın Canlılığı**

Çalışma kapsamında perakende satış noktalarından temin edilen sosislerden, SMS muamelesinde hiçbir depolama gününde canlılık tespit edilmeyen veya yalnızca 0. günde canlı kalan bakterilerin tespit edilebildiği, 4 farklı marka sosis örneklerinin sonuçları tek bir grupta toplandı (Grup 1A). Ön denemeler kapsamında gerçekleştirilen bu analizler birer tekerrür olarak yapıldı. Bu gruptaki farklı markalara ait örnekler A, B, C ve D olarak adlandırıldı. Patojenler bu sosislerde depolama süresince canlılıklarını farklı düzeylerde koruduğu tespit edildi.

### 4.3.1.1. STEC O103 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi

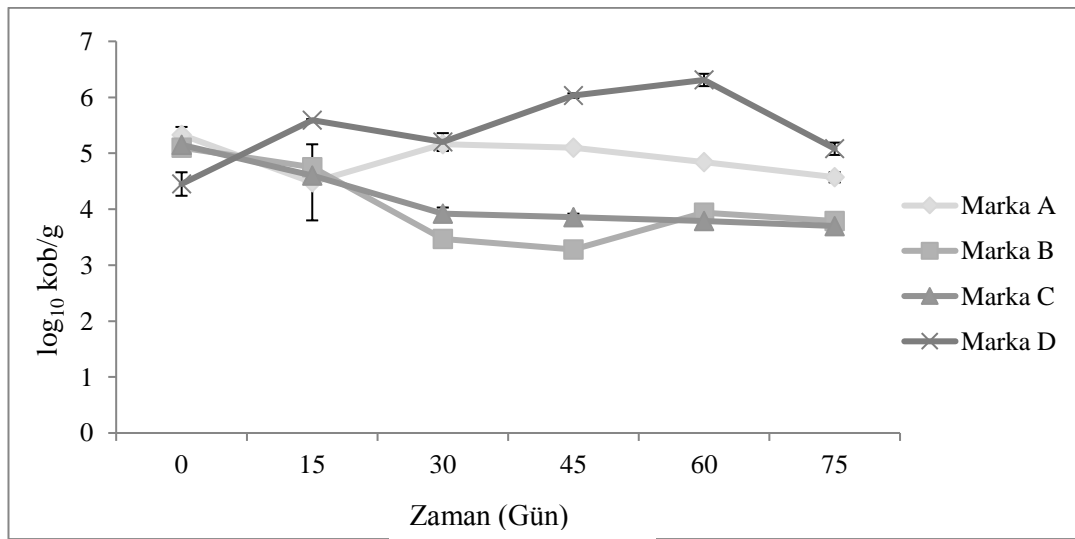
Tablo 4.3: STEC O103 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
A	5,33±0,14 <sup>ax</sup>	4,48±0,68 <sup>by</sup>	5,16±0,11 <sup>abx</sup>	5,10±0,02 <sup>aby</sup>	4,84±0,04 <sup>aby</sup>	4,57±0,09 <sup>abxy</sup>
B	5,1±0,02 <sup>axy</sup>	4,75±0,04 <sup>ay</sup>	3,47±0,0 <sup>by</sup>	3,28±0,03 <sup>bz</sup>	3,94±0,05 <sup>bz</sup>	3,79±0,13 <sup>byz</sup>
C	5,15±0,07 <sup>axy</sup>	4,6±0,01 <sup>aby</sup>	3,92±0,11 <sup>bcy</sup>	3,86±0,06 <sup>z</sup>	3,79±0,07 <sup>cz</sup>	3,7±0,11 <sup>cy</sup>
D	4,45±0,21 <sup>cy</sup>	5,59±0,02 <sup>abx</sup>	5,20±0,16 <sup>bcx</sup>	6,03±0,04 <sup>ax</sup>	6,31±0,11 <sup>ax</sup>	5,08±0,11 <sup>bcx</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

Depolama süresince Grup 1A sosislerde STEC O103 yaşamındaki değişimler Tablo 4.3 ve Şekil 4.2’de gösterilmektedir. STEC O103 canlılığı A, B ve C markalarında depolama sonunda azaldı ve bu azalmalar istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p<0,05$ ). Bununla beraber depolama sonunda A markasında 0,76 log, B markasında 1,31 log ve C markasında 1,45 log azalma tespit edildi. D markasında ise depolama başı ve sonundaki STEC O103 sayısı istatistiksel olarak farklı bulunmadığından sayının depolama süresince korunduğunu söylemek mümkün olmaktadır.



Şekil 4.2: STEC O103 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi

### 4.3.1.2. STEC O26 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi

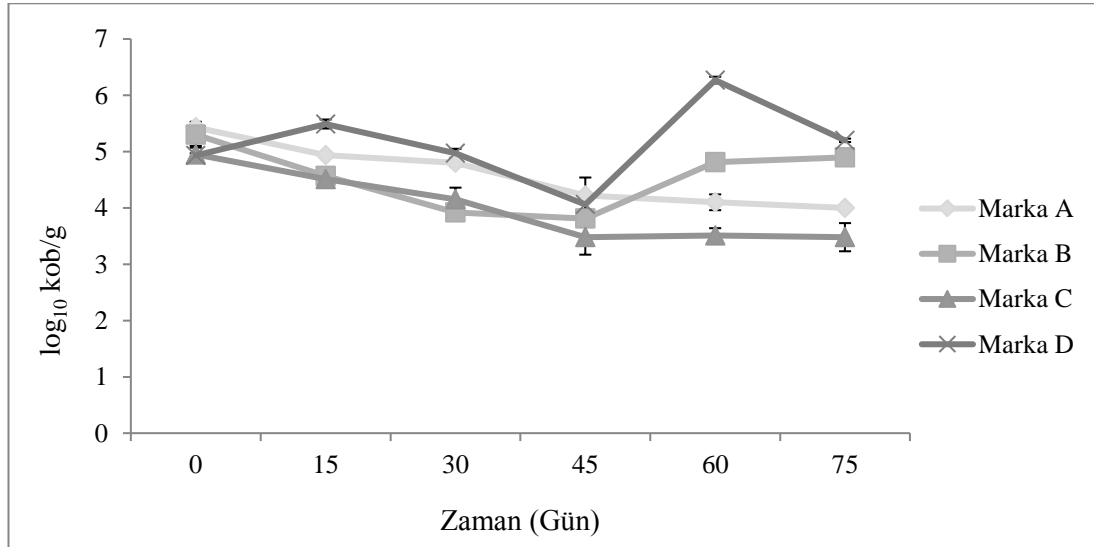
Tablo 4.4: STEC O26 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi ( $\log_{10}$  kob/g)( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
A	5,43±0,06 <sup>ax</sup>	4,94±0,02 <sup>abxy</sup>	4,8±0,06 <sup>abxy</sup>	4,22±0,32 <sup>bcx</sup>	4,10±0,14 <sup>cyz</sup>	4,0±0,05 <sup>cy</sup>
B	5,30±0,23 <sup>ax</sup>	4,57±0,13 <sup>aby</sup>	3,92±0,11 <sup>bz</sup>	3,81±0,33 <sup>bx</sup>	4,81±0,11 <sup>ay</sup>	4,9±0,05 <sup>ax</sup>
C	4,95±0,15 <sup>ax</sup>	4,51±0,13 <sup>aby</sup>	4,15±0,21 <sup>bcyz</sup>	3,48±0,31 <sup>cx</sup>	3,51±0,13 <sup>cz</sup>	3,48±0,25 <sup>cy</sup>
D	4,93±0,04 <sup>bx</sup>	5,49±0,08 <sup>abx</sup>	4,97±0,08 <sup>bx</sup>	4,06±0,08 <sup>cx</sup>	6,27±0,06 <sup>ax</sup>	5,2±0,03 <sup>bx</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

Grup 1A sosislerde 75 günlük depolama süresince STEC O26 yaşamındaki değişimler Tablo 4.4 ve Şekil 4.3’de görülmektedir. STEC O26 canlılığı A, B ve C markalarında depolama süresince azaldı. A markasında 1,43 log, B markasında 0,4 log ve C markasında 1,47 log azalma görüldü. B ve D markalarında 0. ve 75. günlerdeki sayımlar istatistiki olarak farklı bulunmadı ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.3: STEC O26 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi

### 4.3.1.3. STEC O145 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi

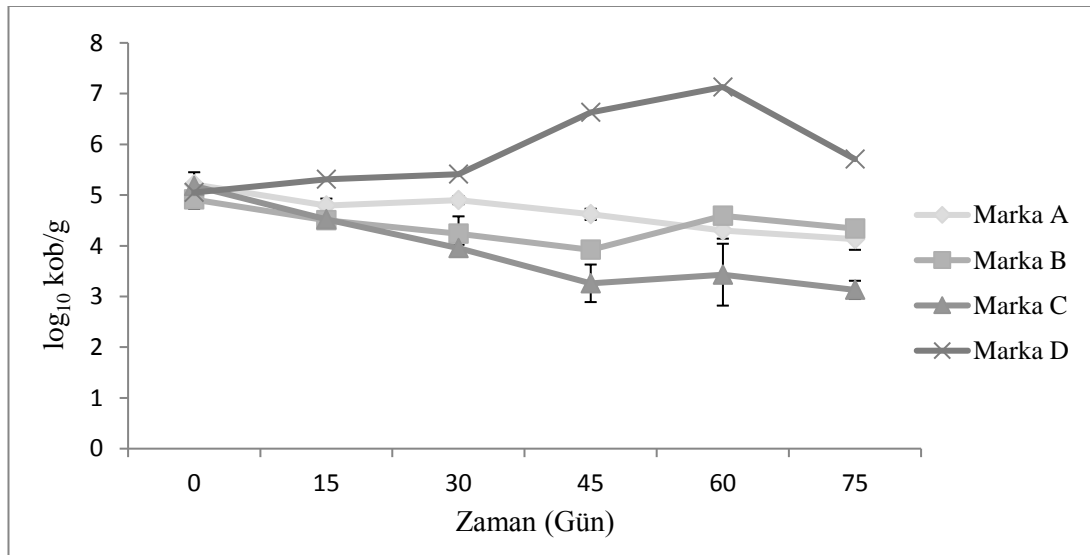
Tablo 4.5: STEC O145 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi ( $\log_{10}$  kob/g)( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
A	5,21±0,24 <sup>ax</sup>	4,79±0,14 <sup>abx</sup>	4,9±0,08 <sup>abxy</sup>	4,62±0,11 <sup>aby</sup>	4,30±0,16 <sup>by</sup>	4,13±0,21 <sup>by</sup>
B	4,91±0,18 <sup>ax</sup>	4,5±0,14 <sup>abx</sup>	4,24±0,34 <sup>abyz</sup>	3,92±0,05 <sup>byz</sup>	4,59±0,08 <sup>aby</sup>	4,34±0,02 <sup>aby</sup>
C	5,18±0,07 <sup>ax</sup>	4,52±0,06 <sup>abx</sup>	3,95±0,07 <sup>bcz</sup>	3,26±0,37 <sup>cz</sup>	3,43±0,61 <sup>cz</sup>	3,13±0,18 <sup>cy</sup>
D	5,05±0,41 <sup>bx</sup>	5,31±0,19 <sup>bx</sup>	5,41±0,01 <sup>bx</sup>	6,63±0,51 <sup>ax</sup>	7,13±0,07 <sup>ax</sup>	5,71±0,09 <sup>bx</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

A, B ve C markalı sosislerdeki STEC O145 canlılığının depolama süresinde azaldığı, A markasında 1,08 log, B markasında 0,57 log ve C markasında 2,05 log canlılık kayıpları olduğu tespit edildi. D markasında ise 45. günde önemli bir artış tespit edildi ( $p<0,05$ ) ancak yine 75. gün ve 0. gün verileri istatistiksel olarak farklı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Depolama süresince STEC O145 yaşamı Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4: STEC O145 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi

#### 4.3.1.4. STEC O157 Canlılığının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi

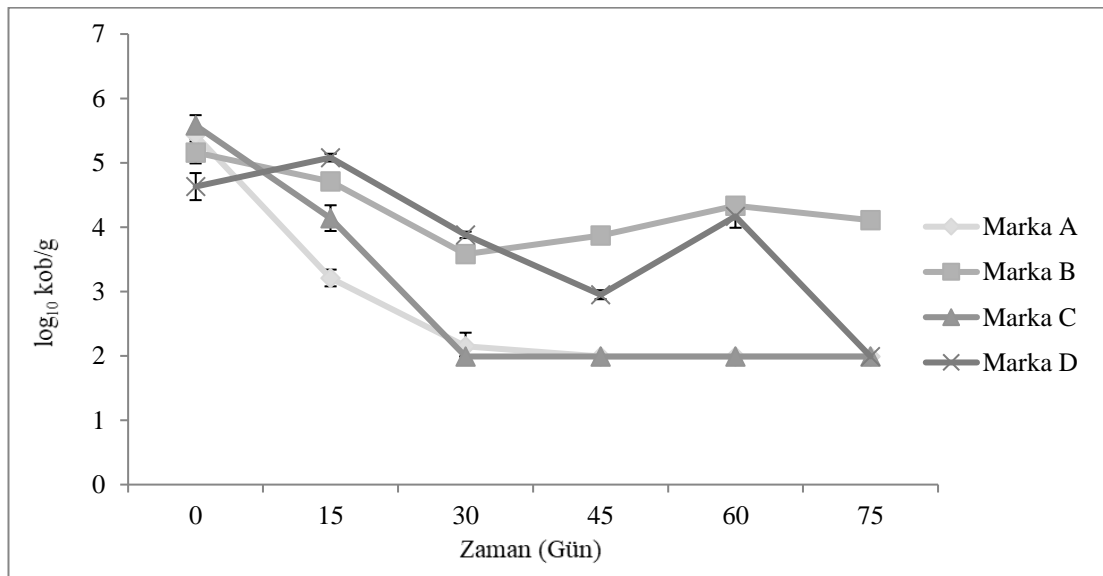
Tablo 4.6: STEC O157 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi ( $\log_{10}$  kob/g)( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
A	5,43±0,06 <sup>ax</sup>	3,21±0,13 <sup>bz</sup>	2,15±0,21 <sup>cy</sup>	<2	<2	<2
B	5,16±0,17 <sup>axy</sup>	4,71±0,02 <sup>abxy</sup>	3,58±0,02 <sup>cx</sup>	3,87±0,04 <sup>cx</sup>	4,33±0,1 <sup>bex</sup>	4,11±0,09 <sup>bex</sup>
C	5,58±0,16 <sup>ax</sup>	4,14±0,2 <sup>by</sup>	<2	<2	<2	<2
D	4,63±0,21 <sup>aby</sup>	5,08±0,06 <sup>ax</sup>	3,88±0,05 <sup>bx</sup>	2,95±0,07 <sup>cy</sup>	4,17±0,18 <sup>bx</sup>	<2

<sup>a,b,c.</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

STEC O157 Grup 1A sosislerinin depolanması süresince canlılığı en düşük patojen olarak tespit edilerek A, C ve D markalarında depolama sonu olan 75. günde tespit edilebilir limitin altında saptandı. En önemli azalma C markasında belirlendi ve 30. günden itibaren tespit edilebilir seviyenin altında saptandı. A markasında ise 45. günden itibaren tespit edilebilir seviyenin altında bulundu. O157 canlılığı B markasında daha yüksek saptandı ve bu markada 75. günde 4,11 log olarak tespit edildi ( $R^2$ : 0,99). Grup 1A sosislerde STEC O157 yaşamındaki değişimler tablo Tablo 4.6 ve Şekil 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.5: STEC O157 Yaşamının Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Değişimi

Depolama süresince Grup 1A sosislerde patojen canlılıkları incelendiğinde genel olarak canlı patojen bakteri sayılarında azalma tespit edildi. Depolama süresince O103, O26 ve O145'in sırasıyla 0,76-1,45 log; 0,4-1,47 log ve 0,57- 2,05 log arasında azalma gösterdiği tespit edildi. STEC O157:H7'nin depolama süresinden önemli ölçüde etkilendiği ancak bu etkilenmenin matrise özel bir etkilenme olduğu söylenebilmektedir. B markasında depolamanın son gününe kadar canlılığını sürdürdüğü ve depolama sonunda 1,05 log azalmış olduğu görülmektedir.

Genel olarak depolama süresince tüm patojenlerin 75. gündeki sayımlarının 0. gündeki sayımlardan daha düşük olduğu tespit edildi. Ancak D marka sosislerde 75. günde tespit edilebilir limitin altına düşen O157 haricinde, patojen sayıları 0. günden daha yüksek bulundu. Bununla beraber bu depolama günlerinde (0 ve 75) istatistiki olarak önemli bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Depolama boyunca canlılık azalmaları üzerinden patojen grupları birbirleri ile kıyaslanacak olursa, STEC O157'nin Grup 1A sosislerde en dayanıksız serogrup, STEC O103'ün ise en dayanıklı serogrup olduğu söylenebilmektedir.

#### 4.3.1.5. Depolama Süresince Grup 1A Sosislerde Rekabetçi Floranın Değişimi

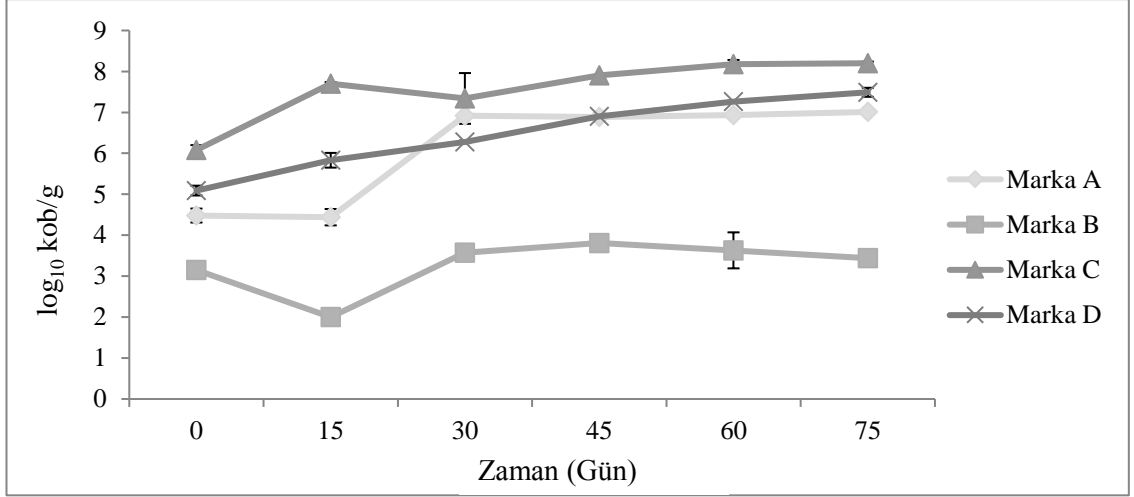
Tablo 4.7: Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Mezofil Aerob Bakteri Sayısındaki Değişim ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
A	4,48±0,17 <sup>by</sup>	4,44±0,2 <sup>bz</sup>	6,92±0,0 <sup>axy</sup>	6,89±0,02 <sup>ay</sup>	6,93±0,03 <sup>ay</sup>	7,01±0,04 <sup>ay</sup>
B	3,15±0,21 <sup>az</sup>	2±0,0 <sup>bt</sup>	3,57±0,11 <sup>az</sup>	3,81±0,07 <sup>az</sup>	3,63±0,44 <sup>az</sup>	3,44±0,05 <sup>az</sup>
C	6,08±0,12 <sup>cx</sup>	7,70±0,04 <sup>abx</sup>	7,34±0,62 <sup>bx</sup>	7,9±0,003 <sup>abx</sup>	8,18±0,1 <sup>ax</sup>	8,20±0,04 <sup>ax</sup>
D	5,09±0,12 <sup>dy</sup>	5,83±0,18 <sup>cdy</sup>	6,28±0,03 <sup>by</sup>	6,90±0,08 <sup>aby</sup>	7,26±0,03 <sup>ay</sup>	7,49±0,11 <sup>axy</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

Grup 1A sosislerde depolama süresince mezofil aerob bakteri sayısı (MAB) değişimleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.6'da gösterilmektedir. MAB sayısı A, C ve D markalı sosislerde depolama süresince artış gösterdi; sırasıyla 2,53 log, 2,12 log ve 2,4 log arttığı tespit edildi. B marka sosislerde ise depolama süresince önemli bir artış tespit edilmedi ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.6: Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Mezofil Aerob Bakteri Sayısındaki Değişim

Laktik asit bakterileri (LAB) sayılarının 75 günlük depolama süresince değişimleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.7’de görülmektedir. LAB sayısı depolama süresince A, C ve D marka sosislerde artış gösterdi. B marka sosislerde ise önemli bir artış tespit edilmedi ( $p>0,05$ ). A ve D markası ile kıyaslandığında C markasında LAB sayısı depolama süresince daha az arttı ancak depolama başında zaten yüksek olan LAB sayısı depolama sonunda da diğer markalara kıyasla önemli oranda yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). C marka sosisler tüm patojenlerin sayılarının depolama süresince en fazla azaldığı örnekler oldu. LAB sayısı en yüksek olan örnekler olmasının patojen sayılarının azalmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Bu sosislerin depolanması süresince, patojen bakterilerin laktik asit bakterileri tarafından üretilen çeşitli antimikrobiyal metabolitler ile etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir.

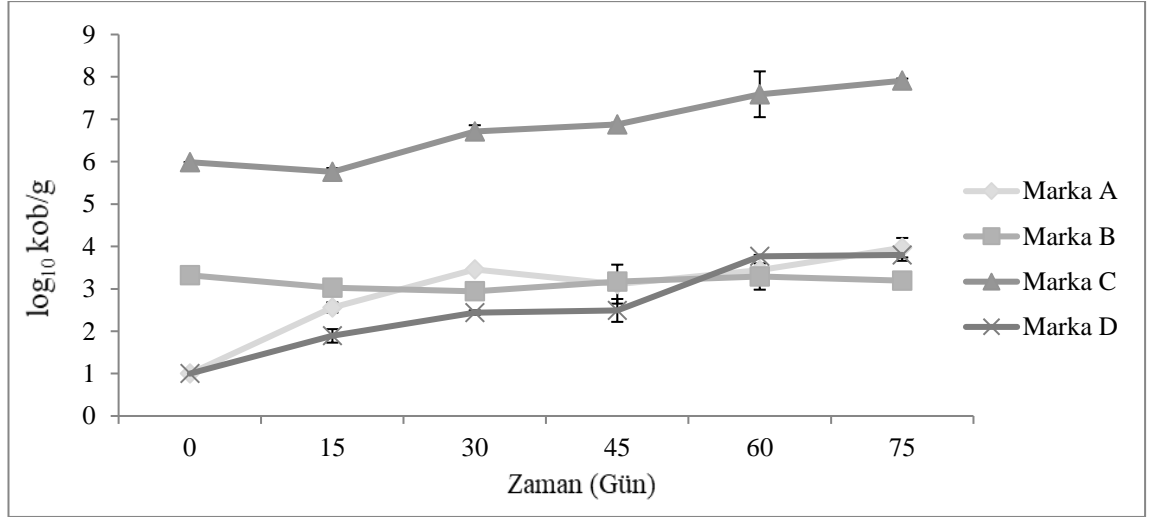
Tablo 4.8: Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Laktik Asit Bakterileri Sayısındaki Değişim ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
A	<1	2,56±0,12 <sup>cyz</sup>	3,46±0,04 <sup>aby</sup>	3,11±0,46 <sup>bcy</sup>	3,44±0,07 <sup>aby</sup>	3,97±0,23 <sup>ay</sup>
B	3,32±0,16 <sup>ay</sup>	3,03±0,11 <sup>ay</sup>	2,94±0,14 <sup>ayz</sup>	3,17±0,12 <sup>ay</sup>	3,29±0,31 <sup>ay</sup>	3,19±0,09 <sup>ay</sup>
C	5,99±0,0 <sup>cdx</sup>	5,76±0,09 <sup>dx</sup>	6,71±0,15 <sup>cx</sup>	6,88±0,04 <sup>bex</sup>	7,59±0,54 <sup>abx</sup>	7,91±0,05 <sup>ax</sup>
D	<1	1,89±0,16 <sup>bz</sup>	2,44±0,05 <sup>bz</sup>	2,49±0,27 <sup>by</sup>	3,77±0,03 <sup>ay</sup>	3,8±0,14 <sup>ay</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )





Şekil 4.7: Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Laktik Asit Bakterileri Sayısındaki Değişim

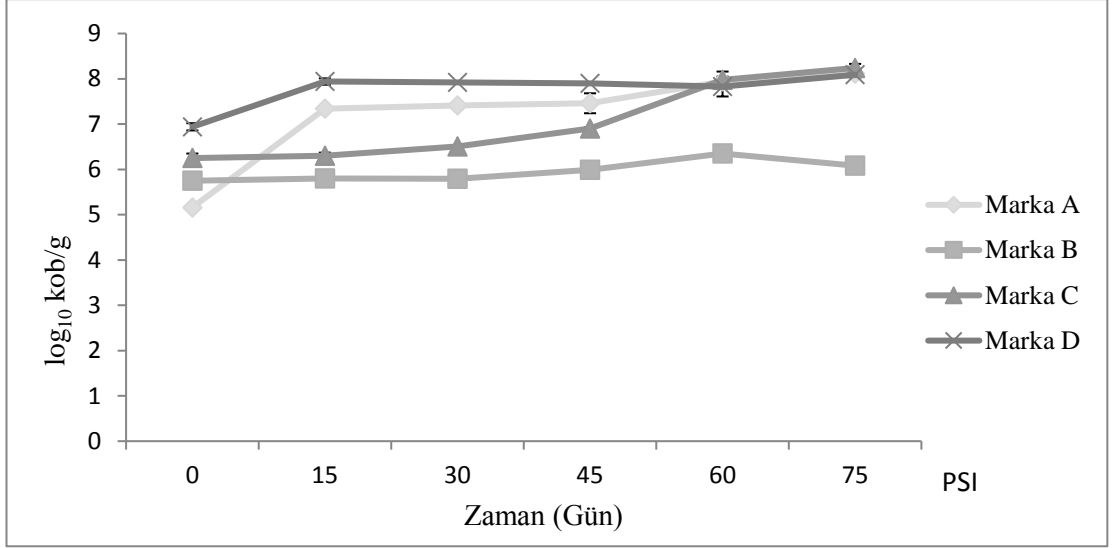
Grup 1A sosislerin depolanması süresince psikrofil bakteri (PB) sayısındaki değişimler Tablo 4.9 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. PB sayıları Grup 1A sosislerin tamamında depolama süresince arttı. Depolama sonunda B marka sosisler en düşük PB sayısına sahip örnekler oldu (6,08 log). Diğer marka örneklerde depolama sonundaki PB sayıları arasında bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Tablo 4.9: Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Psikrofil Bakteri Sayısındaki Değişim ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
A	5,16±0,02 <sup>bz</sup>	7,34±0,0 <sup>ax</sup>	7,41±0,06 <sup>ax</sup>	7,46±0,22 <sup>axy</sup>	7,94±0,06 <sup>ax</sup>	8,11±0,1 <sup>ax</sup>
B	5,75±0,08 <sup>ayz</sup>	5,80±0,04 <sup>ay</sup>	5,79±0,14 <sup>ay</sup>	5,99±0,06 <sup>az</sup>	6,35±0,02 <sup>ay</sup>	6,08±0,0 <sup>ay</sup>
C	6,25±0,1 <sup>bxy</sup>	6,3±0,07 <sup>by</sup>	6,51±0,02 <sup>by</sup>	6,90±0,03 <sup>by</sup>	7,98±0,18 <sup>ax</sup>	8,24±0,09 <sup>ax</sup>
D	6,94±0,08 <sup>bx</sup>	7,94±0,07 <sup>ax</sup>	7,92±0,01 <sup>ax</sup>	7,9±0,01 <sup>ax</sup>	7,83±0,22 <sup>ax</sup>	8,09±0,03 <sup>ax</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.8: Grup 1A Sosislerde Depolama Boyunca Psikrofil Bakteri Sayısındaki Değişim

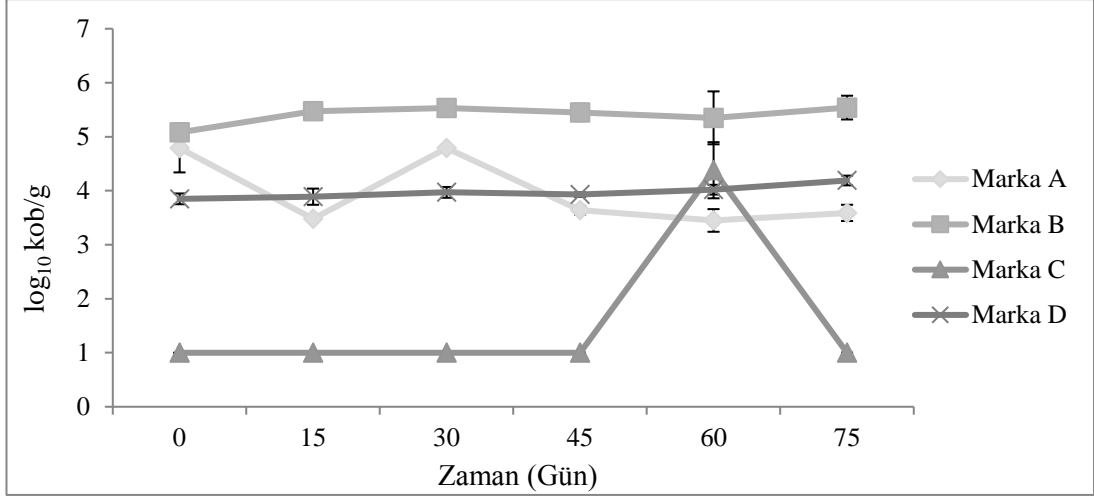
Grup 1A sosis örneklerinde depolama süresince maya sayısındaki değişim Tablo 4.10 ve Şekil4.9'da görülmektedir. Depolama süresince maya sayısının örneklerde azalmış veya değişmemiş olduğu tespit edildi. C marka sosislerde depolamanın 60. gününde elde edilen sayım sonuçlarının analizi yapılan paketteki vakumun bozulmuş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4.10: Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Maya Sayısındaki Değişim (log<sub>10</sub> kob/g) (R<sup>2</sup> 0,99)

Marka	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
A	4,79±0,45 <sup>ax</sup>	3,48±0,0 <sup>by</sup>	4,79±0,05 <sup>ax</sup>	3,64±0,08 <sup>by</sup>	3,45±0,21 <sup>by</sup>	3,59±0,15 <sup>by</sup>
B	5,08±0,11 <sup>ax</sup>	5,47±0,03 <sup>ax</sup>	5,53±0,1 <sup>ax</sup>	5,45±0,16 <sup>ax</sup>	5,35±0,49 <sup>ax</sup>	5,54±0,22 <sup>ax</sup>
C	<1	<1	<1	<1	4,38±0,52	<1
D	3,85±0,1 <sup>ay</sup>	3,89±0,15 <sup>ay</sup>	3,97±0,1 <sup>ay</sup>	3,93±0,04 <sup>ay</sup>	4,02±0,09 <sup>ax</sup>	4,19±0,09 <sup>ay</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)



Şekil 4.9: Grup 1A Sosislerde Depolama Süresince Maya Sayısındaki Değişim

Genel bir değerlendirme yapılacak olursa tüm markalarda dominant flora psikrofil bakteriler olmuştur. Sosislerin buzdolabında depolanmış olması dolayısıyla bu durum doğal görünmektedir.

A marka sosislerde MAB ve PB sayılarının yüksek olmasına rağmen STEC O103'ün depolama süresince diğer serogruplara göre daha yüksek canlılık göstermesi bu patojenin daha rekabetçi olabileceğini düşündürmektedir. STEC O157 haricinde tüm serogruplar bu örneklerde daha yüksek canlılıklarını korumuştur.

C marka sosislerde tüm patojen serogruplarında en yüksek canlılık kayıpları tespit edilmiştir. C marka sosislerde genel mikrofloranın (LAB, PB ve MAB) depolama başında yüksek olması dolayısıyla patojenlerin etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir. Vimont ve ark., *E.coli* O157:H7'nin izolasyonu için sığır kıymasının zenginleştirilmesi sırasında kıymadaki mevcut floranın maksimum seviyelerine ulaşması ile *E.coli* O157:H7'nin gelişmesinin durduğunu tespit etmişlerdir [91]. Vold ve ark., aerobik ve anaerobik olarak depolanan kıyma örneklerinde rekabetçi floranın yüksek olmasının *E.coli* O157:H7'yi inhibe ettiğini belirtmişlerdir [92]. Hwang ve Huang, *E.coli* O157:H7'nin kıymalarda mikroflora tarafından etkilenerek steril kıyma örneklerine göre daha düşük seviyelerde ürediğini tespit etmişlerdir [93]. Bunların yanı sıra LAB'nin patojenlerin canlılıklarına önemli etkisinin olabileceği düşünülmektedir. LAB sayılarının en yüksek tespit edildiği bu örneklerde (C marka) elde edilen sonuçlara bakıldığında STEC patojenleri üzerinde depolama başından beri yüksek olan laktik asit bakterilerinin etkili olmuş olabileceği

tahmin edilmektedir. LAB sayıları dışında benzer mikrobiyal yüke sahip sosis örneklerinde patojen canlılıklarının daha yüksek olması dolayısıyla LAB'nin patojen inhibisyonunda baskılayıcı rol oynuyor olabileceği düşünülmektedir. Literatürde de LAB'nin *E.coli* suşlarının inhibisyonunda rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Smith ve ark., *Lactobacillus acidophilus*'un 4 suşunun kıymada ve sıvı besiyerinde *E.coli* inhibisyonuna katkısını araştırmış, aralarında sosisten izole edilen bir suşun da bulunduğu bakterilerin ayrı ayrı ve karışım halinde *E.coli* O157:H7 sayılarının düşmesine katkı sağladıklarını bulmuşlardır [94]. Bununla beraber Kirsch ve ark., LAB'nin O157 ve non-O157 izolatlarının sığır konfrfilelerinde inhibisyonunda tek başına değil başka stratejiler ile beraber etkili olabileceğini belirtmişlerdir [95].

B marka sosislerde MAB ve LAB sayıları depolama süresince önemli artış göstermedi. Psikrofil bakteri sayıları ise 60. günden itibaren artış göstermiş olsa da diğer markalara kıyasla düşük seyrettiği belirlendi. Bu marka sosislerde bir çeşit antimikrobiyal katkı olması söz konusu olabileceği düşünülmektedir. Bu sosislerde rekabetçi floranın baskılanmış olmasının patojenlere kolaylık sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Diğer serogruplara göre en dayanıksız serogrup olarak tespit edilen STEC O157 bile, diğer markalarda 75. günde tespit limitinin altında kalmasına rağmen bu markada 75. günde 4,11 log<sub>10</sub> olarak tespit edilmiştir. Et ve et ürünlerinde mikrobiyal gelişmeyi yavaşlatarak raf ömrünün uzatılmasını sağlayabilecek çeşitli katkıları üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Bingöl ve Bostan, (2007), konsantrasyona bağlı olarak sodyum laktat kullanımının sosis depolamasında mikrobiyal gelişmeyi geciktirdiğini belirtmişlerdir [96]. Sodyum laktatın nötre yakın pH'da gıdaların raf ömrünü uzattığı belirtilmiştir [97]. Öte yandan sığır köftelerinde yapılan bir çalışmada kontrol grubu ile kıyaslandığında sodyum laktat ilavesi *E.coli* O157:H7 sayısında bir değişime neden olmazken takip eden dondurma ve pişirme gibi çeşitli streslerle inhibisyona katkı sağladığı tespit edilmiştir [98].

#### **4.3.2. Grup 1B Sosislerde Depolama Süresince Patojenlerin ve Rekabetçi Floranın Canlılığı**

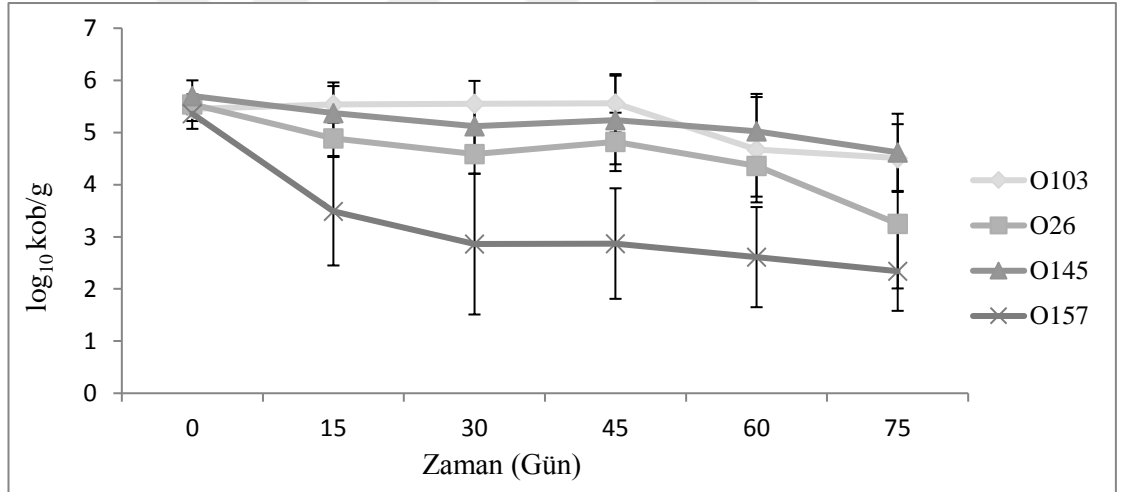
Piyasadan temin edilen ve SMS deneylerinde 0. gün dışında da canlılık tespit edilen sosisler bu grup (Grup 1B) altında incelendi. Aynı markaya ait bu sosislerin

analizleri 3 tekerrür olarak gerçekleştirildi. Grup 1B sosis örneklerinde STEC serogruplarının yaşama Tablo 4.11 ve Şekil 4.10'da gösterilmektedir.

Tablo 4.11: Grup 1B Sosislerde Depolama Süresince STEC Serogruplarının Canlılığı ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,91)

Serogrup	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
103	5,45±0,23 <sup>ax</sup>	5,54±0,35 <sup>ax</sup>	5,55±0,44 <sup>ax</sup>	5,56±0,56 <sup>ax</sup>	4,67±1,01 <sup>abx</sup>	4,51±0,65 <sup>bx</sup>
26	5,54±0,19 <sup>ax</sup>	4,89±0,34 <sup>abx</sup>	4,59±0,38 <sup>by</sup>	4,82±0,56 <sup>abx</sup>	4,36±0,59 <sup>bx</sup>	3,25±1,24 <sup>cy</sup>
145	5,70±0,3 <sup>ax</sup>	5,37±0,59 <sup>abx</sup>	5,12±0,46 <sup>abxy</sup>	5,24±0,85 <sup>abx</sup>	5,02±0,72 <sup>abx</sup>	4,62±0,74 <sup>bx</sup>
157	5,36±0,29 <sup>ax</sup>	3,49±1,04 <sup>by</sup>	2,86±1,35 <sup>bz</sup>	2,87±1,06 <sup>by</sup>	2,61±0,96 <sup>by</sup>	2,34±0,76 <sup>by</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p < 0,05$ )  
<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p < 0,05$ )



Şekil 4.10: Grup 1B Sosislerde Depolama Süresince STEC Serogruplarının Canlılığı

Grup 1B sosislerde depolama süresince tüm patojenlerin canlılıklarında kayıplar belirlendi. Bu sosislerde STEC O103'ün depolama boyunca canlı bakteri sayısı (kob) depolamanın ilk 60 gününde istatistiksel olarak değişmedi ( $p > 0,05$ ). 60. günden sonra önemli düşüş tespit edildi ve depolama sonunda toplam 0,94 log azaldı. Depolama süresince STEC O26 sayısında 2,29 log, O145 sayısında 1,08 log, STEC O157 sayısında ise 3,02 log azalma tespit edildi ( $R^2$  0,91).

Tablo 4.12: Grup 1B Sosislerde Depolama Süresince Rekabetçi Floradaki Değişim ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,94 )

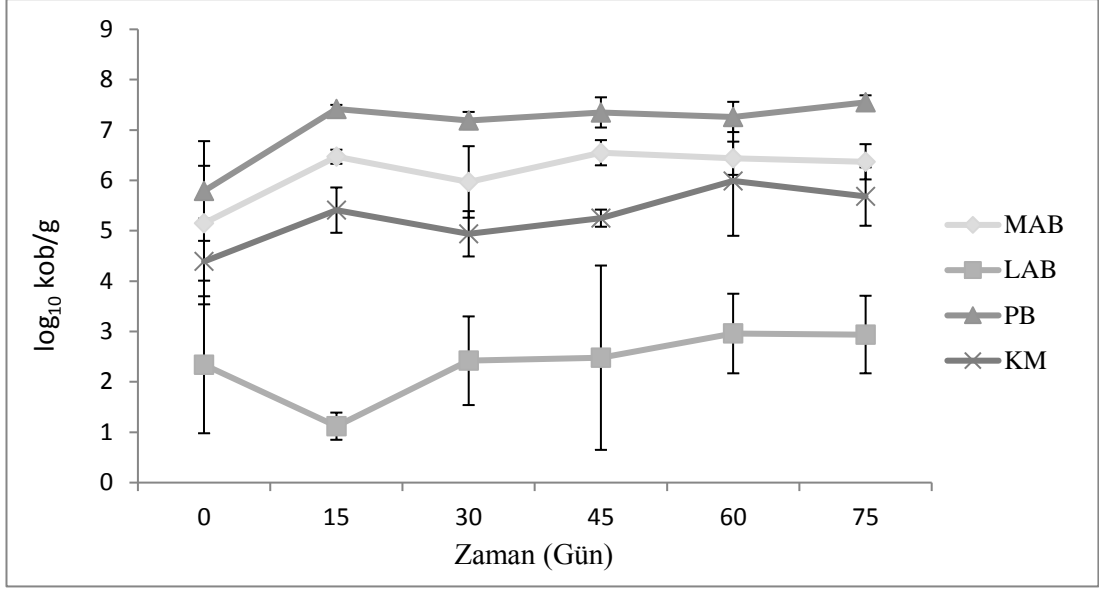
Analiz*	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
MAB	5,15±1,14 <sup>bxy</sup>	6,47±0,14 <sup>axy</sup>	5,97±0,71 <sup>abxy</sup>	6,55±0,25 <sup>axy</sup>	6,44±0,33 <sup>axy</sup>	6,37±0,35 <sup>abxy</sup>
LAB	2,34±1,36 <sup>abz</sup>	1,12±0,27 <sup>bz</sup>	2,42±0,88 <sup>abz</sup>	2,89±1,83 <sup>az</sup>	3,12±0,79 <sup>az</sup>	3,35±0,77 <sup>az</sup>
PB	5,79±0,99 <sup>bx</sup>	7,42±0,08 <sup>ax</sup>	7,19±0,17 <sup>abx</sup>	7,35±0,30 <sup>ax</sup>	7,26±0,30 <sup>ax</sup>	7,55±0,14 <sup>ax</sup>
Maya	4,39±0,85 <sup>by</sup>	5,41±0,45 <sup>aby</sup>	4,94±0,45 <sup>aby</sup>	5,25±0,17 <sup>aby</sup>	5,59±0,61 <sup>aby</sup>	5,68±0,58 <sup>ay</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

\*MAB:Mezofil Aerob Bakteri, LAB:Laktik Asit Bakterisi, PB: Psikrofil Bakteri

Grup 1B sosislerin MAB, LAB, PB ve maya sayısı değişimleri Tablo 4.12 ve Şekil 4.11’de verilmiştir. MAB ve PB sayısı depolama ile arttığı tespit edildi. LAB sayısı ise depolama süresince önemli bir artış göstermedi. Bu grup örneklerde MAB ve PB sayıları Grup 1A sosislerindeki bazı markalar ile benzerlik gösterse de LAB depolama süresince oldukça az sayıda tespit edildi. MAB ve PB sayılarının ani bir artış gösterdiği 15.günde patojen canlılıklarında çeşitli düşüşler tespit edildi. Bu düşüş en yüksek STEC O157’de gerçekleşirken STEC O103’te 60. güne kadar önemli bir düşüş olmadı. Bu patojenin diğer serogruplara göre daha rekabetçi olduğu fikri bu sonuçlarla da desteklenmektedir. Yine STEC O145 Grup 1A sosislerde olduğu gibi O103’ten sonra bu koşullardan en az etkilenen serogrup olmuştur. Depolama süresince canlılık kayıpları en çok STEC O157’de olup sırasıyla O26, O145 ve O103 şeklinde gerçekleşti.



Şekil 4.11: Depolama Süresince Grup 1B Sosislerde Rekabetçi Floradaki Değişim

#### 4.2.3. Grup 2 Sosislerde Patojenlerin ve Rekabetçi Floranın Depolama Süresince Canlılığı

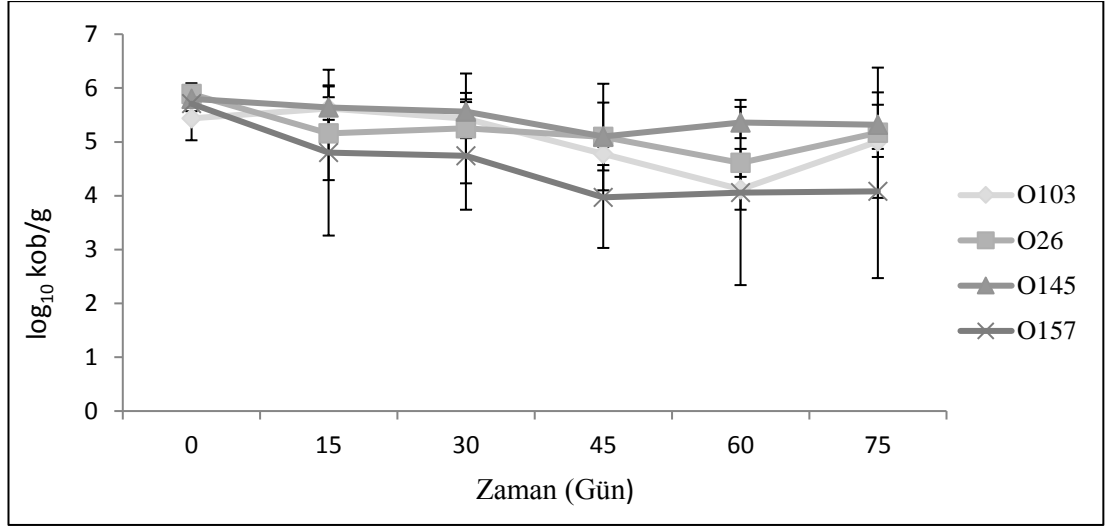
Deneysel olarak ürettirilen ve pişirme işlemi laboratuvarında gerçekleştirilen sosislerin sonuçları bu grupta değerlendirildi. Grup 2 sosis örneklerinde depolama süresince STEC serogruplarının değişimi Tablo 4.13 ve Şekil 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.13: Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince STEC Serogruplarının Canlılığı (log<sub>10</sub> kob/g) (R<sup>2</sup> 0,87)

Serogrup	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
O103	5,44±0,41 <sup>ax</sup>	5,62±0,21 <sup>ax</sup>	5,43±0,36 <sup>ax</sup>	4,78±0,21 <sup>abx</sup>	4,12±0,38 <sup>by</sup>	4,01±0,14 <sup>by</sup>
O26	5,89±0,20 <sup>ax</sup>	5,16±0,87 <sup>abx</sup>	5,25±1,02 <sup>abx</sup>	5,09±0,99 <sup>abx</sup>	4,61±0,26 <sup>bxy</sup>	5,17±1,21 <sup>abx</sup>
O145	5,80±0,16 <sup>ax</sup>	5,64±0,41 <sup>ax</sup>	5,56±0,35 <sup>ax</sup>	5,10±0,63 <sup>ax</sup>	5,36±0,29 <sup>ax</sup>	5,32±0,60 <sup>ax</sup>
O157	5,71±0,14 <sup>ax</sup>	4,80±1,54 <sup>abx</sup>	4,74±1,00 <sup>bx</sup>	3,97±0,94 <sup>cy</sup>	4,11±1,64 <sup>bcy</sup>	4,08±1,61 <sup>bcy</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)



Şekil 4.12: Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince STEC Serogruplarının Canlılığı

Grup 2 sosislerde STEC O103 sayısının depolamanın 45. gününe kadar önemli bir düşüşe uğramadığı ( $p>0,05$ ), depolama süresince bakteri sayısındaki toplam azalmanın 1,43 log olduğu belirlendi. Depolama boyunca STEC O26 sayısı 0,72 log, STEC O145 sayısı 0,48 log ve STEC O157 sayısı 1,63 log azaldı. Canlı bakteri sayısı (kob) Grup 2 sosislerinin depolanması süresince en fazla düşüş gösteren serogrup STEC O157 oldu. STEC O145 sayısı depolama süresince önemli düşüş göstermedi ( $p>0,05$ ). Grup 2 sosislerde depolamaya bağlı patojen bakteri sayısındaki azalmalar Grup 1B sosislerine kıyasla daha az olduğu görüldü.

Grup 2 sosislerde depolama süresince MAB, LAB, PB ve maya sayılarındaki değişimler Tablo 4.14 ve Şekil 4.13’de gösterilmektedir.

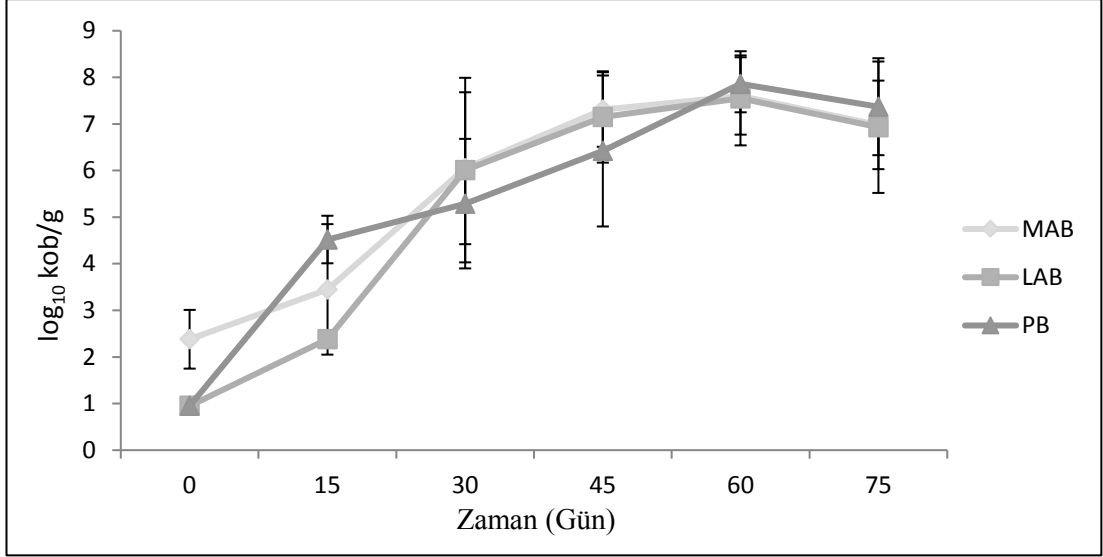
Tablo 4.14: Grup 2 Sosislerde Depolama Boyunca Rekabetçi Floradaki Değişim ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,99)

Analiz*	Zaman (Gün)					
	0	15	30	45	60	75
MAB	2,38±0,63 <sup>d</sup>	3,45±1,4 <sup>cy</sup>	6,05±1,63 <sup>bx</sup>	7,31±0,8 <sup>ax</sup>	7,6±0,83 <sup>ax</sup>	6,98±0,95 <sup>ax</sup>
LAB	<1	2,38±0,07 <sup>cy</sup>	6,01±1,98 <sup>bxy</sup>	7,15±0,98 <sup>ax</sup>	7,55±1,01 <sup>ax</sup>	6,93±1,41 <sup>ax</sup>
PB	<1	3,92±0,51 <sup>cx</sup>	5,29±1,39 <sup>cy</sup>	6,42±1,62 <sup>by</sup>	7,86±0,61 <sup>ax</sup>	7,37±1,04 <sup>ax</sup>
Maya	<1	<1	<1	<1	<1	<1

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

\*MAB: Mezofil Aerob Bakteri, LAB: Laktik Asit Bakterisi, PB: Psikrofil Bakteri





Şekil 4.13: Grup 2 Sosislerde Depolama Boyunca Rekabetçi Floradaki Değişim

Grup 2 sosislerde depolama süresince maya sayısı tespit limitinin altında seyretti. Bu matriste depolama boyunca MAB, LAB ve PB sayısı özellikle 15.günden sonra önemli artış gösterdi ( $p < 0,05$ ). 60. günde depolamanın en yüksek rakamlarına ulaştı ardından 75. günde sayısal olarak azalma tespit edildi. Ortamda besin maddelerinin azalması, metabolitlerin birikimi ve rekabet gibi stres faktörleri dolayısıyla depolamanın son 15 gününde düşüş gözlenmiş olabileceği düşünülmektedir. Rekabetçi flora sayılarındaki önemli artışa rağmen patojen canlılıklarının önemli düzeyde etkilenmemiş olmasının örneklerin pH'sı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Grup 2 sosis örneklerinin depolama süresince pH ve titrasyon asitliği değerleri Tablo 4.28'de gösterilmektedir. Grup 2 sosislerde depolama başında pH  $5,18 \pm 0,26$  iken depolama sonu pH  $5,56 \pm 0,1$  olarak tespit edildi ve istatistiksel olarak depolama boyunca bir farklılık belirlenmedi ( $p > 0,05$ ). Bu gruptaki örneklerin pH'sı diğer gruplara göre daha düşük olmakla beraber bu pH'da patojenlerin stres adaptasyonu tetiklenerek rekabetçi floranın olumsuz etkileri gibi çevresel faktörlere karşı da direnç kazanmış olmaları muhtemeldir. Örneklerin pH'sının yanında depolama başlangıcında rekabetçi floranın oldukça düşük seviyelerde olmasının da patojenlere avantaj sağlamış olabileceği ve canlılıklarının depolamanın ilerleyen günlerinde önemli düzeyde etkilenmemesi sonucuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

#### 4.4. Sentetik Mide Sıvısı Deneyleri Sonuçları

##### 4.4.1. Grup 1A Sosislerdeki Patojenlerin SMS Deneylerinde Canlılıkları

Grup 1A sosis örneklerinde depolama süresince patojenler belirli düzeylerde canlılıklarını korumuş ancak SMS deneylerinde 0. gün haricinde canlılık tespit edilmemiştir. SMS 0.gün sonuçları Tablo4.15, 4.16, 4.17 ve 4.18’de gösterilmektedir.

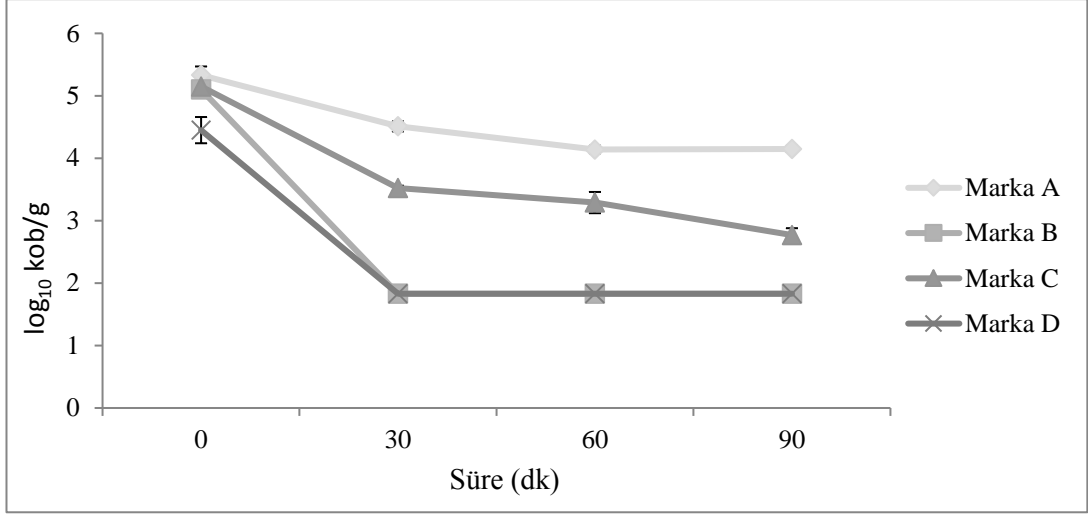
Grup 1A sosislerde STEC O103 yaşamının 0. gün SMS deneylerinde değişimi Tablo 4.15ve Şekil 4.14’de görülmektedir. STEC O103 A marka sosislerde SMS deneylerinde 90 dakika süresince canlılığını korudu ve 90 dakika sonunda 1,18 log azalma meydana geldi. 60 ile 90. dakikalarda kuyruk etkisi (tailing effect) gözlemlendi. C marka sosislerde canlı bakteri sayıları daha düşük olmakla beraber yine 90 dakika süresince canlılık belirlendi. Bu marka sosislerde 90dakika sonunda 2,38 log azalma tespit edildi ( $R^2:0,99$ ). Diğer markalarda (B ve D) SMS deneylerinde STEC O103 sayıları tespit limitinin altında kaldı.

Tablo 4.15: O103 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
A	5,33±0,14 <sup>ax</sup>	4,51±0,08 <sup>abx</sup>	4,14±0,06 <sup>bx</sup>	4,15±0,05 <sup>bx</sup>
B	5,1±0,02 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
C	5,15±0,07 <sup>ax</sup>	3,52±0,04 <sup>by</sup>	3,29±0,17 <sup>bx</sup>	2,77±0,11 <sup>cy</sup>
D	4,45±0,21 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.14: O103 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi

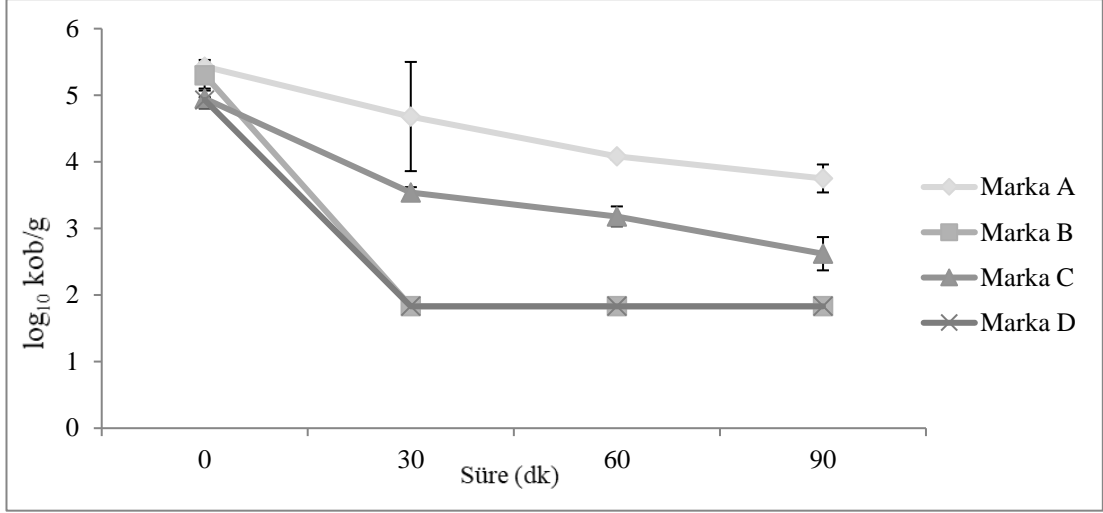
Grup 1A sosislerin SMS deneylerinde STEC O26 yaşamının değişimi Tablo 4.16 ve Şekil Tablo 4.15.'de verilmiştir. STEC O26'nın A ve C marka sosislerde SMS muamelesinin 30. dakikasından itibaren canlı bakteri sayısında istatistiki olarak önemli azalma olmadı. A marka sosislerde 90 dk sonunda canlı bakteri sayısında 1,68 log, C marka sosislerde ise 2,33 log azalma tespit edildi.

Tablo 4.16. O26 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
A	5,43±0,06 <sup>ax</sup>	4,68±0,82 <sup>abx</sup>	4,08±0,05 <sup>bx</sup>	3,75±0,21 <sup>bx</sup>
B	5,30±0,23 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
C	4,95±0,15 <sup>ax</sup>	3,54±0,08 <sup>by</sup>	3,18±0,15 <sup>bx</sup>	2,62±0,25 <sup>by</sup>
D	4,93±0,04 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p < 0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p < 0,05$ )



Şekil 4.15. O26 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi

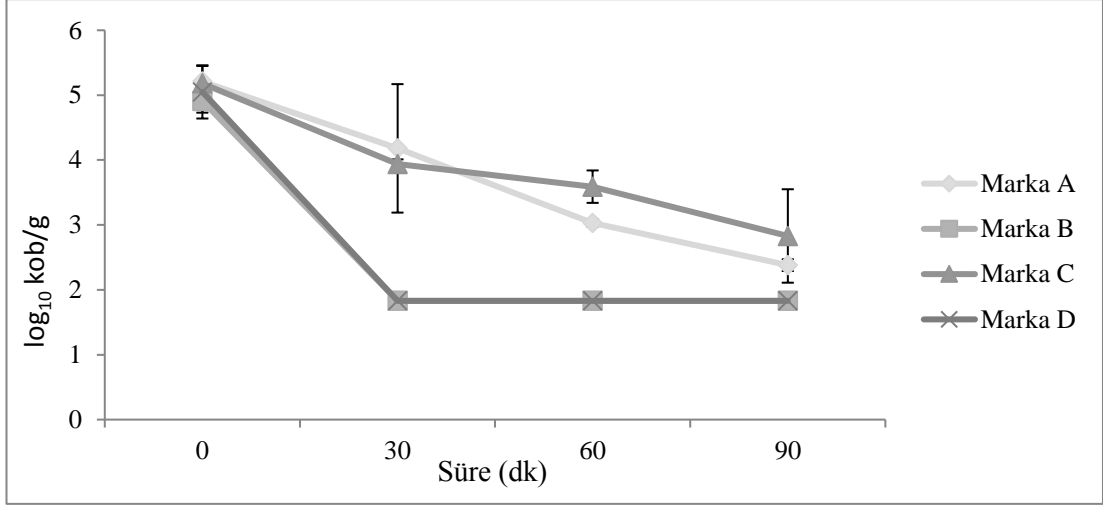
Grup 1A sosislerin 0. Gün SMS deneylerinde STEC O145 yaşamının değişimi Tablo 4.17 ve Şekil 4.16 'da görülmektedir. STEC O145, SMS ile muamele sonunda A marka sosislerde canlı bakteri sayısında 2,83 log, C marka sosislerde ise 2,35 log azalma oldu.

Tablo 4.17 O145 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi (log<sub>10</sub> kob/g) (R<sup>2</sup> 0,99)

Marka	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
A	5,21±0,24 <sup>ax</sup>	4,18±0,99 <sup>bx</sup>	3,03±0,06 <sup>cx</sup>	2,38±0,09 <sup>cx</sup>
B	4,91±0,18 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
C	5,18±0,07 <sup>ax</sup>	3,94±0,07 <sup>bx</sup>	3,59±0,25 <sup>bcx</sup>	2,83±0,72 <sup>cx</sup>
D	5,05±0,41 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)



Şekil 4.16: O145 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi

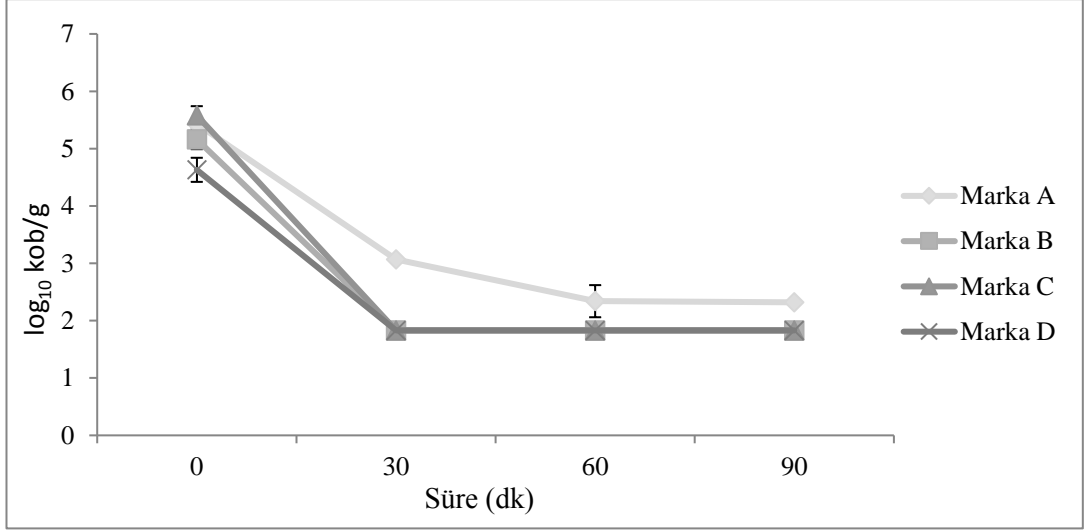
STEC O157 yaşamının Grup 1A sosislerin 0. Gün SMS deneylerindeki değişimleri Tablo 4.18 ve Şekil 4.17’de verilmiştir. SMS’da STEC O157 canlı bakteri sayısı C markasında da B ve D markasında olduğu gibi tespit limitinin altında belirlendi. A markasında canlı bakteri sayısında 90dk sonunda 3,11 log azalma görüldü ancak 30. dakikadan itibaren canlı bakteri sayıları farklı bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Tablo 4.18. O157 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,99)

Marka	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
A	5,43±0,06 <sup>ax</sup>	3,07±0,0 <sup>b</sup>	2,34±0,28 <sup>b</sup>	2,32±0,0 <sup>b</sup>
B	5,16±0,17 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
C	5,58±0,16 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
D	4,63±0,21 <sup>x</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.17 O157 Canlılığının Grup 1A Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi

Grup 1A sosislerde depolamanın ilerleyen günlerinde SMS dayanımı saptanmadı, patojen sayıları tespit limitinin altında kaldı.

B markalı sosislerde diğer depolama günlerinde olduğu gibi 0. günde de tüm patojen bakteri serogrupları SMS deneylerinde tespit edilebilir limitin altında saptandı. B marka sosislerde rekabetçi floranın baskılanmasına neden olduğu düşünülen muhtemel antimikrobiyal katkının patojenler üzerinde oluşturduğu stresin takip eden SMS stresine karşı hassasiyet gelişimine katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir.

C marka sosislerde 0. gün dışında SMS deneylerinde patojenler tespit limitinin altında kaldı. C marka sosisler patojen sayılarının depolamada en çok azaldığı sosisler oldu. Bu matriste patojen popülasyonlarının çeşitli etmenlerle zayıfladığı düşünülmektedir. Depolama süresince matriste mevcut olan LAB'nin katkı sağladığı düşünülen pH düşüşünün (Tablo 4.19), patojenlerin asit tolerans cevaplarının gelişmesine yol açarak metabolitlere olan hassasiyetin artmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Hsin-Yi ve Chou, (2001), asit adaptasyonun organizmanın bakteriyosinler, hidrojen peroksit, etanol ve diasetil gibi antimikrobiyal maddelere olan hassasiyetini arttırdığı görüşünü sunmuşlardır [99]. Bu örneklerin pH'sının patojenlerin LAB metabolitlerine karşı hassasiyetini arttırmış ve takip eden asit stresinde dayanımlarının düşmesine neden olmuş olabileceği düşünülmektedir.

A, B ve D marka sosislerde tüm faktörlerin yanı sıra örneklerin pH'larının da asit hassasiyetine yol açmış olabileceği düşünülmektedir (Tablo 4.19). *E.coli* O157:H7'nin nötrale yakın pH ortamlarında stresli ortamlara göre daha fazla asit hassasiyeti gösterebileceği belirtilmiştir. *E.coli*'nin çevresel stres sinyalleri almadığı ve/veya asit stresinin bulunmadığı gıda ortamlarında düşük ATR sergileyebilecekleri düşünülmektedir [99]. Grup 1A sosislerde depolamada süresince pH ve titrasyon asitliği değişimi Tablo 4.19'de gösterilmektedir.

Tablo 4.19: Grup 1A Örneklerde Depolama Süresince pH ve % Laktik Asit Değişimi

Marka		Gün					
		0	15	30	45	60	75
pH	A	6,5	6,55	6,18	6,09	6,1	6,3
	B	6,61	6,35	6,41	6,3	6,23	6,54
	C	5,89	5,53	4,8	4,75	4,84	4,95
	D	6,43	5,93	5,65	5,8	6,05	6,01
% Laktik Asit	A	0,144	0,207	0,297	0,306	0,27	0,279
	B	0,261	0,432	0,45	0,423	0,513	0,234
	C	0,306	0,351	0,468	0,36	0,567	0,288
	D	0,216	0,315	0,576	0,37	0,271	0,207

Markalar arasındaki arası asit dayanımı farklılıklarının diğer faktörlerin yanı sıra nitrit içeriği farklılıklarının da katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Bir sonraki kısımda bu konuya ayrıntılı olarak değinilmiştir.

#### 4.4.2. Grup 1B Sosislerde Patojenlerin SMS Deneylerinde Canlılığı

Aynı markaya ait sosis örneklerinin 3 tekerrür halinde analiz edildiği bu grupta SMS deneylerinde patojenlerin asit dayanımları değişen oranlarda depolamanın belirli günlerine kadar devam ettiği tespit edildi.

Grup 1B sosis örneklerinin SMS deneylerinde STEC O26 yaşamındaki değişimler Tablo 4.20 ve Şekil 4.19.'da verilmiştir. SMS deneylerinde STEC O26 canlılığı 0. günde ilk 30 dk içerisinde önemli bir düşüş ( $p < 0,05$ ) gösterdi ancak daha sonra önemli değişim göstermedi ( $p > 0,05$ ). Depolamanın 15. ve 45. gününde yine ilk

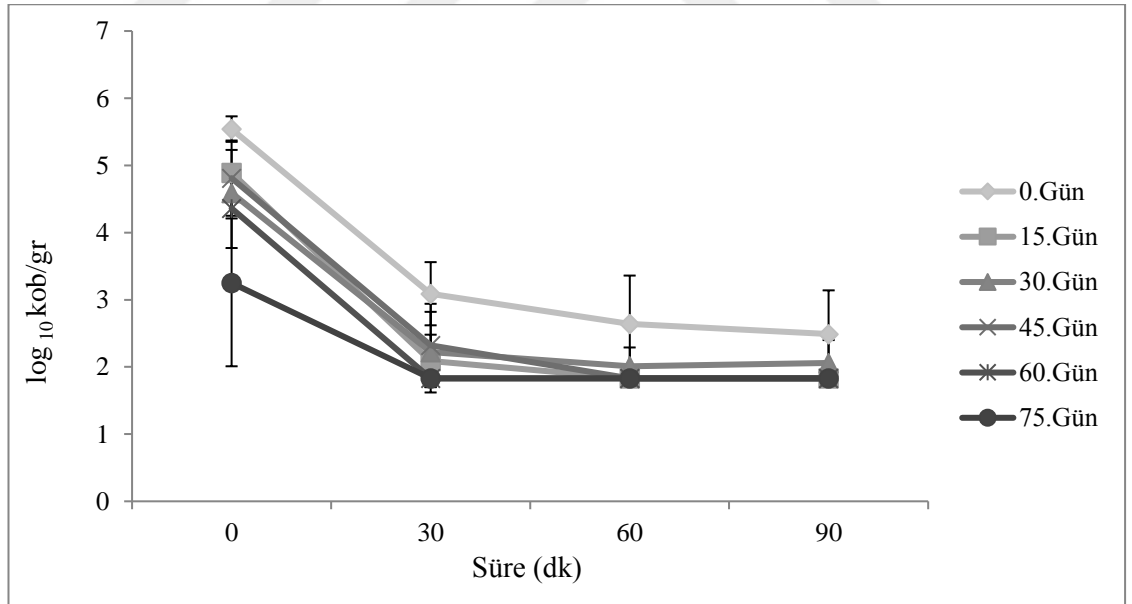
30 dakikada gerçekleşen sayılardaki önemli azalmadan ( $p<0,05$ ) sonra tespit edilebilir seviyenin altına düştüğü belirlendi. 45. günden sonraki depolama günlerinde yapılan analizlerde SMS deneylerinde tespit edilemedi ( $R^2: 0,95$ ).

Tablo 4.20: STEC O26'nın Depolama Süresince Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2 0,95$ )

Günler	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
0	5,54±0,19 <sup>ax</sup>	3,09±0,62 <sup>bx</sup>	2,58±0,78 <sup>bx</sup>	2,42±0,69 <sup>bx</sup>
15	4,89±0,34 <sup>axy</sup>	2,09±0,39 <sup>by</sup>	<1,84	<1,84
30	4,59±0,38 <sup>ay</sup>	2,22±0,60 <sup>bxy</sup>	2,01±0,28 <sup>bx</sup>	2,06±0,34 <sup>bx</sup>
45	4,82±0,56 <sup>axy</sup>	2,32±0,62 <sup>bxy</sup>	<1,84	<1,84
60	4,36±0,59 <sup>y</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
75	3,25±1,24 <sup>z</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.19: STEC O26 Canlılığının Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi

Grup 1B sosislerin SMS deneylerinde STEC O103 canlılığı Tablo 4.21. ve Şekil 4.20.'de görülmektedir. STEC O103 SMS deneylerinde canlılığı tüm depolama günlerinde ilk 30 dakika içerisinde önemli düşüş gösterdi ( $p<0,05$ ). Depolamanın 0. gününde bu düşüş diğer örnekleme dakikalarında da kademeli olarak devam ettiği



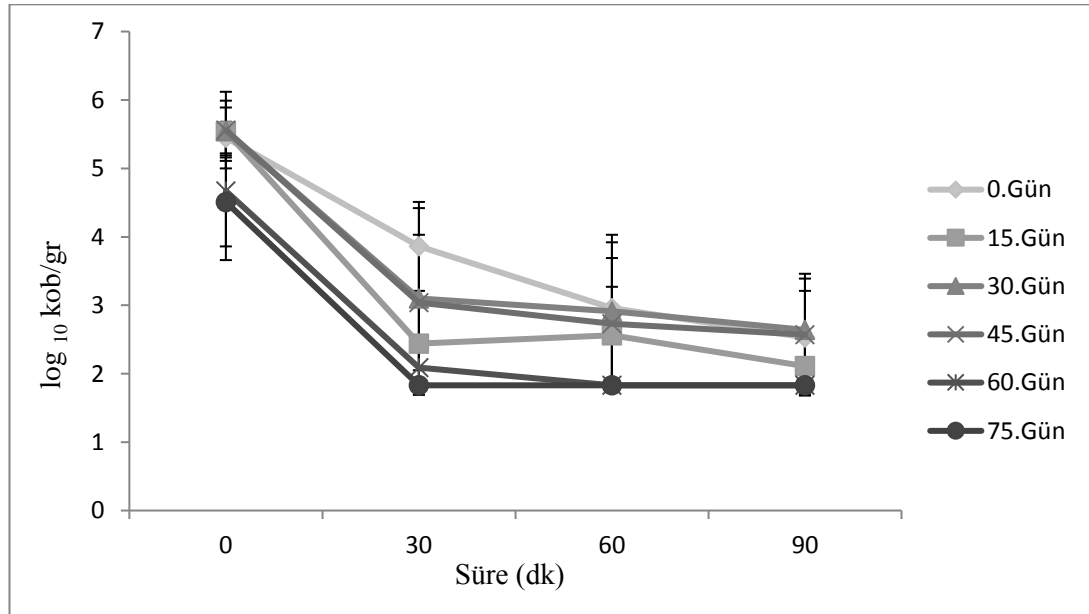
görüldü. Bununla beraber 15, 30 ve 45. günlerde SMS deneylerinde 30, 60 ve 90. dakikalarda canlılık önemli olarak değişmedi ( $p>0,05$ ). Depolamanın 60. gününde SMS deneylerinin 60. ve 90. dakikalarında 75. günde ise SMS muamelesinden sonra hiçbir örnekleme dakikasında tespit edilemedi. Bakteri SMS deneylerinin 45.gününde 90.dakikaya kadar canlı iken, 60. günün 30.dakikasından sonra tespit edilemedi.

Tablo 4.21: STEC O103'ün Depolama Süresince Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,95)

Günler	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
0	5,45±0,23 <sup>ax</sup>	3,86±0,65 <sup>bx</sup>	2,96±1,07 <sup>bcx</sup>	2,53±0,68 <sup>cx</sup>
15	5,54±0,35 <sup>ax</sup>	2,44±0,68 <sup>by</sup>	2,56±0,71 <sup>bx</sup>	2,11±0,42 <sup>bx</sup>
30	5,55±0,44 <sup>ax</sup>	3,10±1,32 <sup>bx</sup>	2,91±1,01 <sup>bx</sup>	2,64±0,75 <sup>bx</sup>
45	5,56±0,56 <sup>ax</sup>	3,04±0,99 <sup>bx</sup>	2,73±0,96 <sup>bx</sup>	2,57±0,89 <sup>bx</sup>
60	4,67±1,01 <sup>axy</sup>	2,09±0,40 <sup>by</sup>	<1,84	<1,84
75	4,51±0,65 <sup>y</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.20: STEC O103 Canlılığının Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi

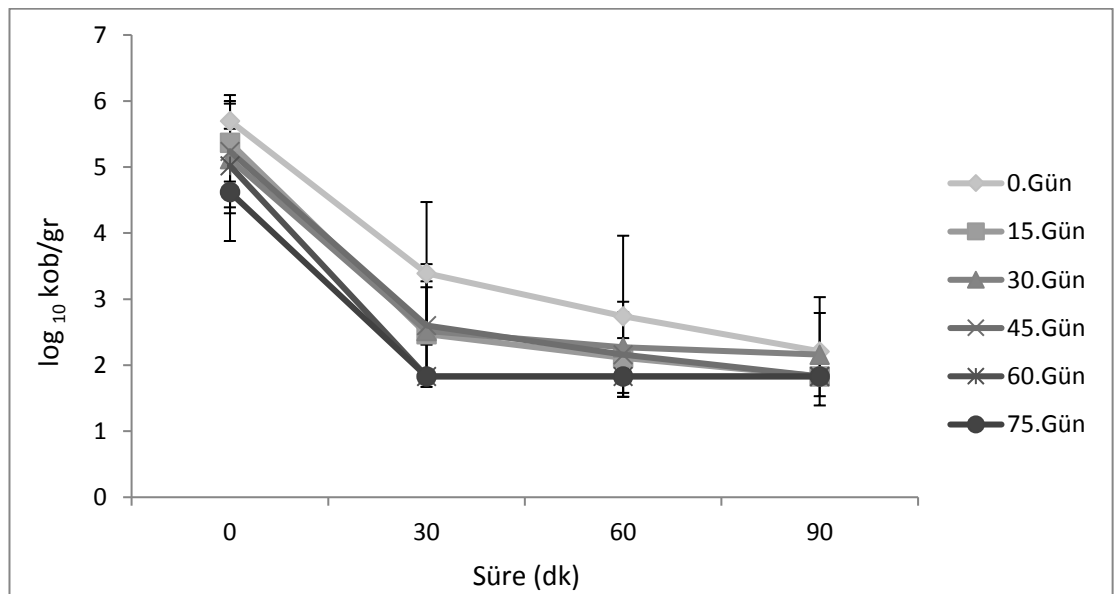
Grup 1B sosislerin SMS deneylerinde STEC O145 yaşamındaki değişimler Tablo 4.22 ve Şekil 4.21’de verilmiştir. Depolamanın 0. gününde SMS deneylerinde STEC O145 canlılığı ilk 30 dakikada önemli düşüş ( $p<0,05$ ) gösterdi ancak 90 dakikalık maruziyet sonunda 2,21 log olarak tespit edildi. 0. ve 30. günde SMS deneyinde canlılığı analiz dakikalarında değişmedi ( $p>0,05$ ). 45. günden itibaren asit dayanımı zayıfladığı, depolamanın 60. ve 75. günlerinde SMS deneylerinde tespit edilebilir limitin altında kaldığı saptandı.

Tablo 4.22. STEC O145’in Depolama Süresince Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,95)

Günler	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
0	5,70±0,30 <sup>ax</sup>	3,39±1,08 <sup>bx</sup>	2,74±1,22 <sup>bx</sup>	2,21±0,82 <sup>bx</sup>
15	5,37±0,59 <sup>axy</sup>	2,47±0,71 <sup>bx</sup>	2,11±0,30 <sup>bx</sup>	<1,84
30	5,12±0,46 <sup>axy</sup>	2,52±0,75 <sup>bx</sup>	2,27±0,69 <sup>bx</sup>	2,16±0,63 <sup>bx</sup>
45	5,24±0,85 <sup>axy</sup>	2,60±0,93 <sup>bx</sup>	2,16±0,64 <sup>bx</sup>	1,84 <sup>bx</sup>
60	5,02±0,72 <sup>xy</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
75	4,62±0,74 <sup>y</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.21: STEC O145 Canlılığının Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi

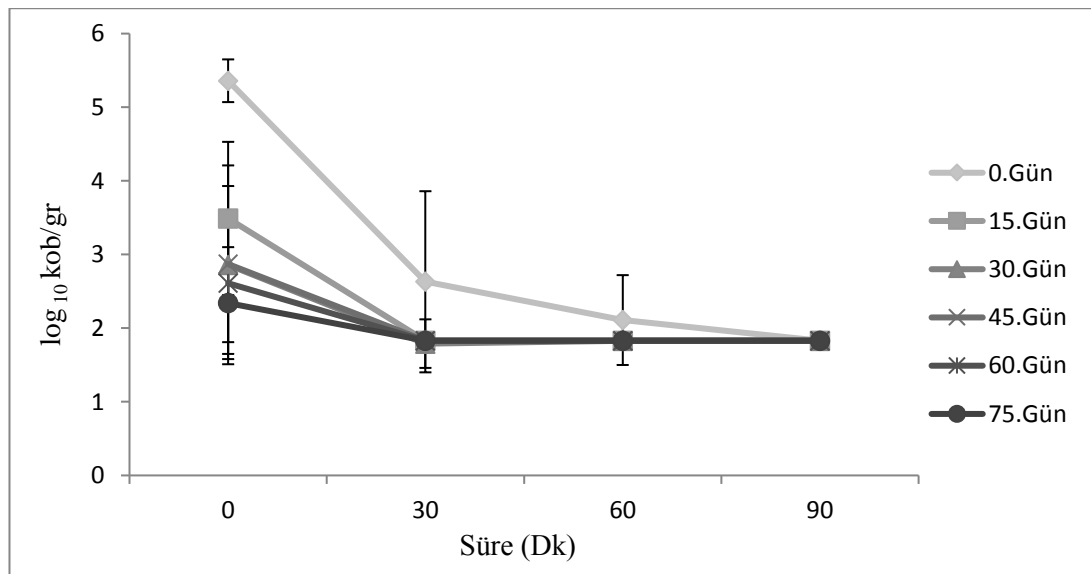
Grup 1B sosislerin SMS deneylerinde STEC O157 yaşamının değişimi Tablo 4.23 ve Şekil 4.22’de gösterilmektedir. STEC O157 Grup 1B sosis örneklerinin depolanması sırasında diğer patojenlere göre daha kısa süreli SMS dayanımı gösterdiği saptandı. Depolamanın 30. gününden sonra SMS deneylerinde tespit limitinin altında seyrettiği belirlendi. Bu tabloda patojenin 0. dk sayımlarındaki azalmalar da dikkat çekici görünmektedir. Patojenin mevcut ortamda hayatta kalma oranı zayıfladığından asit stresine karşı daha duyarlı olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber başlangıç (SMS’na giriş) sayısının nispeten yüksek olduğu 0. günde de diğer patojenlere kıyasla asit stresine daha duyarlı olduğu görülmektedir.

Tablo 4.23: STEC O157’nin Depolama Süresince Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,95)

Günler	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
0	5,36±0,29 <sup>ax</sup>	2,63±1,23 <sup>bx</sup>	2,11±0,61 <sup>bx</sup>	<1,84
15	3,49±1,04 <sup>y</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
30	2,86±1,35 <sup>ay</sup>	1,90±0,15 <sup>bx</sup>	<1,84	<1,84
45	2,87±1,06 <sup>y</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
60	2,61±0,96 <sup>y</sup>	<1,84	<1,84	<1,84
75	2,34±0,76 <sup>y</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.22: STEC O157 Canlılığının Grup 1B Sosislerin SMS Deneylerinde Değişimi

Genel olarak değerlendirildiğinde Grup 1B sosislerde SMS dayanımı en yüksek serogrup STEC O103, en düşük serogrup ise yine STEC O157 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.24: Depolama Boyunca Grup 1B Örneklerde pH ve % Laktik Asit Değişimi

Analiz	Günler					
	0	15	30	45	60	75
pH	6,74±0,02 <sup>a</sup>	6,44±0,16 <sup>ab</sup>	6,07±0,3 <sup>b</sup>	5,98±0,07 <sup>bc</sup>	5,56±0,31 <sup>cd</sup>	5,13±0,1 <sup>d</sup>
%Laktik Asit	0,243±0,02	0,306±0,02	0,261±0,04	0,267±0,05	0,429±0,07	0,489±0,15

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir (p<0,05)

Grup 1A ve Grup 1B sosislerde tespit edilen SMS dayanımındaki varyasyonların sosislerin nitrit içeriklerindeki farklılıklardan da kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Mide sıvısının nitrit varlığında bakterilerin yıkımlanmasında daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Düşük pH'da nitritin daha büyük bir kısmı ayrılmamış formda olacağından antimikrobiyal etkinin arttığı belirtilmektedir [100]. Nitrit, asidik koşullarda nitroz asit, peroksinitrit, nitrojen dioksit, nitrik oksit gibi nitrojen bileşiklerine dönüşmekte ve bu bileşiklerin normal insan midesinde patojen eliminasyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir [101,102].

Dykhuisen ve ark., yaptıkları *in vitro* çalışmada *Y. enterocolitica*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Shigella sonnei* ve *E.coli* O157 'nin asitlendirilmiş nitrit ile inhibisyonunu incelemiş, *E.coli* O157'nin diğer patojenlere göre nitrit olmayan düşük pH'larda daha dayanıklı iken nitrit ilavesiyle bu farklılığın ortadan kalktığını vurgulamışlardır [103]. Nitrit ile pH arasındaki sinerjistik ilişki tüm patojenler için gözlenebilmekte iken yalnızca asit ortamın tek başına daha az etkili olduğu hatta bazı durumlarda bakterilerin üremelerinin devam ettiğini kaydetmişlerdir [103,104]. Xu ve ark., yaptıkları çalışmada nitritin düşük pH ile kombinasyonunun *E.coli* hücrelerinin öldürülmesine katkı sağladığı sonucuna varmışlardır [105]. Araştırmacılar bu antimikrobiyal etkinin asidik koşulda oluşan nitroz asit dolayısıyla olabileceğini belirtmişlerdir. Benjamin ve ark., *E.coli*'nin pH 3'te 1 saatlik inkübasyonunda 10 µM kadar düşük bir konsantrasyonda nitrit ile hassasiyetinin

arttığını tespit etmişlerdir [106]. Buchanan ve Bagi, sodyum nitrit içeren sıvı besiyeri ortamında *E.coli*O157:H7 inhibisyonunun pH ile kuvvetli bir ilişkiye sahip olduğunu,  $pH \leq 5,5$  koşullarında önemli inhibisyon tesiri olduğunu ve inkübasyon sıcaklığı düşürüldüğünde bu inhibisyonun arttığını belirtmişlerdir [90].

Sodyum nitritin fermente sosislerde de *E.coli* inhibisyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Düşük pH'ya sahip ve 50 ppm düzeyinde nitrit içeren sosislerde bile nitrit içermeyen sosislere göre *E.coli* sayılarında daha hızlı azalma olduğu belirlenmiştir [107]. Konvansiyonel sosisler nitrit içermeyen organik sosislerle kıyaslandığında da benzer sonuçlar gözlenmiştir [108]. Salamlara 100-500 ppm aralığında nitrit ilavesi ile yapılan bir çalışmada nitrit miktarının artırılması ile bakteri sayılarının daha çok azaldığı ifade edilmiştir [109]. Bu çalışmada sosis matrisinde canlılıklarını koruyan patojenlerinin SMS deneylerinde hayatta kalamamalarına ve özellikle örnekler arasındaki farklılıklara sodyum nitrit içeriğindeki farklılıkların da katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde satışa sunulan sosislerin nitrit içeriklerinin yasal limitlerin üzerinde olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Sezer ve ark., marketlerde satışa sunulan sosislerin kalıntı nitrit ve nitrat miktarlarını incelemiş, örneklerin %45'inin kalıntı nitrat miktarının ve %90'ının kalıntı nitrit (min. 92 mg/kg ve mak. 403 mg/kg) miktarının yasal limitlerin üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir [61]. Soyutemiz ve Özenir, sosis örneklerinin % 66,6'sının limitlerin üzerinde nitrit (mak. 152,97 ppm) ve nitrat içerdiğini bildirmişlerdir [109].

Bu çalışmada Grup 1B sosisleri ile aynı markaya ait başka denemeler yapılmış ancak bu yapılan denemelerde elde edilen 3 tekerrür dışında SMS deneylerinde canlılık tespit edilmemiştir (bu denemelerin sonuçları verilmemiştir). Rekabetçi flora seviyelerinin benzer olduğu, aynı marka sosislerde görülen bu değişken sonuçların başka faktörlerin yanı sıra sodyum nitrit içeriği farklılığından da kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Ancak çalışmada nitrit içerikleri ile ilgili bir analiz yapılmadığını ve nitritin sosis ile asit ortamda bakteriyel yıkımlanmaya olan katkısının tam olarak anlaşılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalar yapmak gerektiğini belirtmek gereklidir.

#### 4.4.3. Grup 2 Sosislerde Patojenlerin SMS Deneylerinde Canlılığı

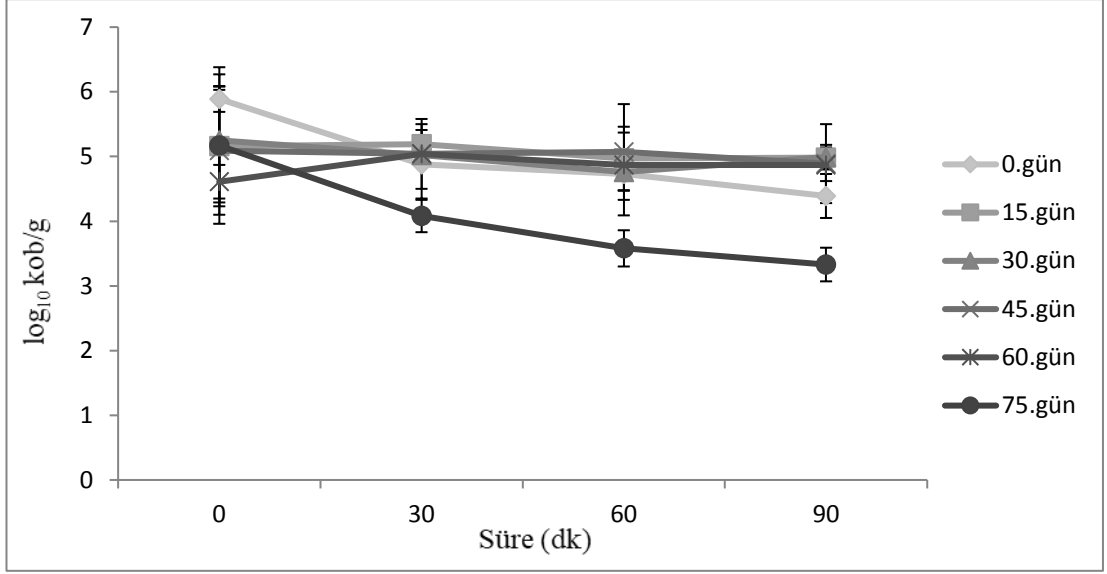
Grup 2 sosis örneklerinde SMS deneylerinde STEC O26 yaşamındaki değişimler Tablo 4.25 ve Şekil 4.24’de verilmiştir. STEC O26 canlılığı depolamanın 0. gününde SMS maruziyeti sonunda 1,5 logazalma gösterdi. 15. günden itibaren SMS deneylerinde önemli canlılık kayıpları tespit edilmezken ( $p>0,05$ ), 75. günde asit dayanımının zayıfladığı tespit edildi. Bakterinin depolamanın 15. gününden itibaren SMS’na yüksek dayanım gösterdiği tespit edildi. Ancak 75. günde SMS deneyleri süresince gözlemlenen kuyruk etkisine rağmen daha zayıf bir asit dayanımı sergiledi. Depolamanın son günü olan 75. günde çeşitli faktörlere bağlı gelişen metabolik yorgunluğun popülasyonda stres dayanımını azaltmış olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.25: STEC O26’nın Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince SMS Deneylerinde Değişimi (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,93)

Günler	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
0	5,89±0,2 <sup>ax</sup>	4,88±0,53 <sup>abx</sup>	4,73±0,64 <sup>abxy</sup>	4,39±0,34 <sup>bxy</sup>
15	5,16±0,87 <sup>axy</sup>	5,19±0,31 <sup>ax</sup>	4,97±0,48 <sup>axy</sup>	4,98±0,16 <sup>ax</sup>
30	5,25±1,01 <sup>axy</sup>	5,02±0,18 <sup>ax</sup>	4,76±0,29 <sup>axy</sup>	4,99±0,19 <sup>ax</sup>
45	5,09±0,99 <sup>axy</sup>	5,04±0,54 <sup>ax</sup>	5,07±0,74 <sup>ax</sup>	4,89±0,61 <sup>ax</sup>
60	4,61±0,26 <sup>ay</sup>	5,04±0,14 <sup>ax</sup>	4,87±0,22 <sup>axy</sup>	4,87±0,25 <sup>ax</sup>
75	5,17±1,21 <sup>axy</sup>	4,08±0,25 <sup>abx</sup>	3,58±0,28 <sup>by</sup>	3,33±0,26 <sup>by</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.24: STEC O26 Canlılığının Grup 2 Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi

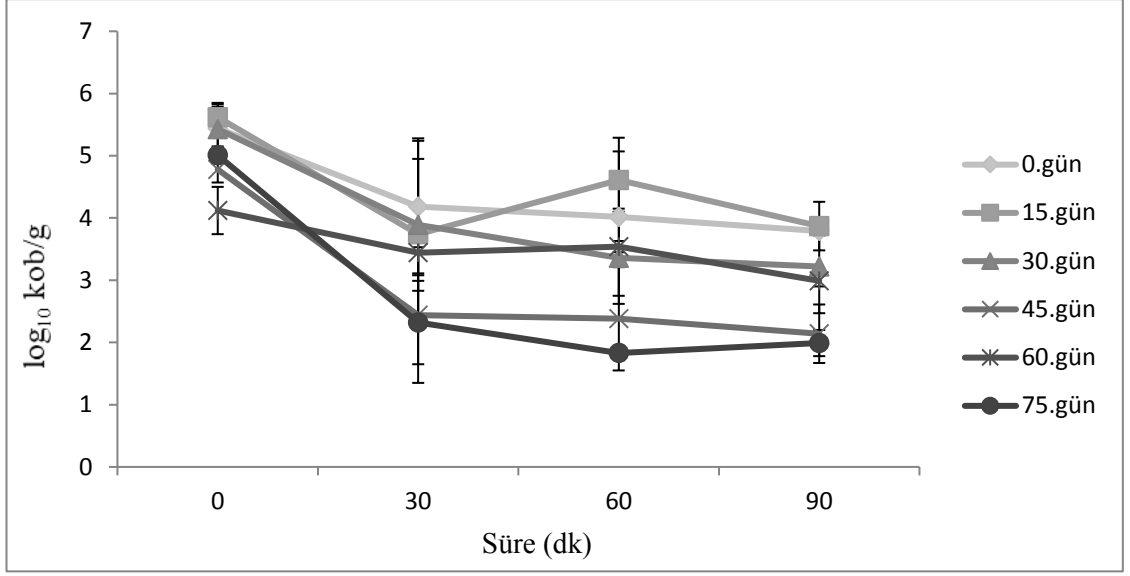
SMS deneylerinde STEC O103 canlılığı depolamanın 60. günü haricinde ilk 30 dakika sonunda önemli düşüşler gösterdi. Ancak takip eden sürelerde (60. ve 90. dakikalar) istatistiksel olarak önemli düşüşler görülmedi, kuyruk etkisi oluştu. 60.günde ise SMS maruziyeti ile örnek alınan hiçbir dakikada istatistiksel olarak önemli düşüşler tespit edilmedi. Depolama sonu olan 75. gün depolama günleri arasında asit dayanımının en düşük gözleendiği gün olmuştur (Tablo 4.26, Şekil 4.25).

Tablo 4.26 STEC O103'ün Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince SMS Deneylerinde Değişimi (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,93)

Günler	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
0	5,44±0,41 <sup>ax</sup>	4,18±1,10 <sup>bx</sup>	4,02±1,27 <sup>bx</sup>	4,39±0,07 <sup>abx</sup>
15	5,62±0,21 <sup>ax</sup>	3,74±1,5 <sup>bx</sup>	4,37±0,46 <sup>abx</sup>	4,05±0,39 <sup>bxy</sup>
30	5,43±0,36 <sup>ax</sup>	3,89±1,06 <sup>bx</sup>	3,36±0,74 <sup>bx</sup>	3,22±0,75 <sup>bxyz</sup>
45	4,78±0,21 <sup>axy</sup>	3,10±1,08 <sup>bxy</sup>	3,46±0,07 <sup>bx</sup>	2,73±0,15 <sup>byz</sup>
60	4,12±0,38 <sup>ay</sup>	4,27±0,33 <sup>ax</sup>	3,70±0,09 <sup>ax</sup>	3,38±0,09 <sup>axyz</sup>
75	5,01±0,14 <sup>axy</sup>	2,32±0,39 <sup>by</sup>	<1,84	1,89±0,12 <sup>bz</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p<0,05$ )



Şekil 4.25: STEC O103 Canlılığının Grup 2 Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi

SMS deneylerinde O145 asit dayanımı incelendiğinde depolamanın 45. gününe kadar ilk 30 dk içerisinde canlılıkta önemli düşüşler olduğu ancak SMS deneyleri sırasında canlılığın anlamlı olarak düşmediği tespit edildi. 45. ve 60.günlerde 0, 30, 60 ve 90. dakikalar arasında tam bir kuyruk etkisi saptandı. Takip eden günlerde asit dayanımı azalmış olsa da depolama sonu olan 75. günde halen devam ettiği görüldü ve SMS maruziyeti sırasında canlılıktaki azalma 1,65 log olarak tespit edildi (Tablo 4.27, Şekil 4.26).

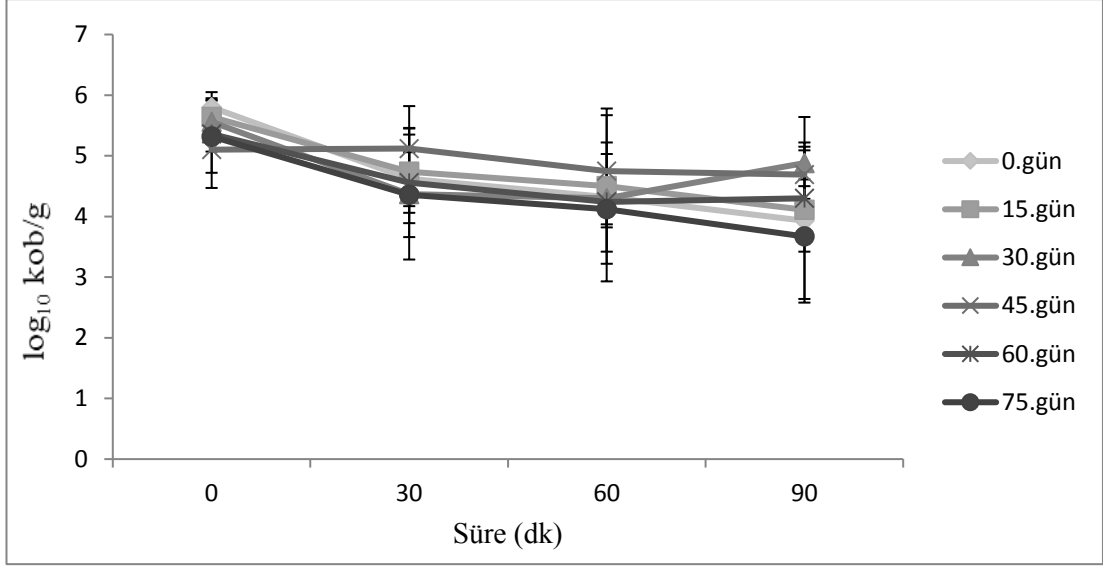
Tablo 4.27 STEC O145'in Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince SMS Deneylerinde Değişimi (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,93)

Günler	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
0	5,80±0,15 <sup>ax</sup>	4,62±0,73 <sup>bx</sup>	4,32±0,90 <sup>bx</sup>	3,93±1,29 <sup>bx</sup>
15	5,64±0,41 <sup>ax</sup>	4,74±1,08 <sup>abx</sup>	4,50±1,28 <sup>abx</sup>	4,11±1,53 <sup>bx</sup>
30	5,56±0,35 <sup>ax</sup>	4,37±1,18 <sup>bx</sup>	4,30±1,37 <sup>bx</sup>	4,88±0,27 <sup>abx</sup>
45	5,10±0,63 <sup>ax</sup>	5,12±0,34 <sup>ax</sup>	4,75±0,28 <sup>ax</sup>	4,69±0,40 <sup>ax</sup>
60	5,36±0,29 <sup>ax</sup>	4,56±0,5 <sup>ax</sup>	4,24±0,37 <sup>ax</sup>	4,30±0,2 <sup>ax</sup>
75	5,32±0,60 <sup>ax</sup>	4,36±0,19 <sup>abx</sup>	4,12±0,3 <sup>abx</sup>	3,67±0,25 <sup>bx</sup>

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p < 0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p < 0,05$ )





Şekil 4.26. STEC O145 Canlılığının Grup 2 Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi

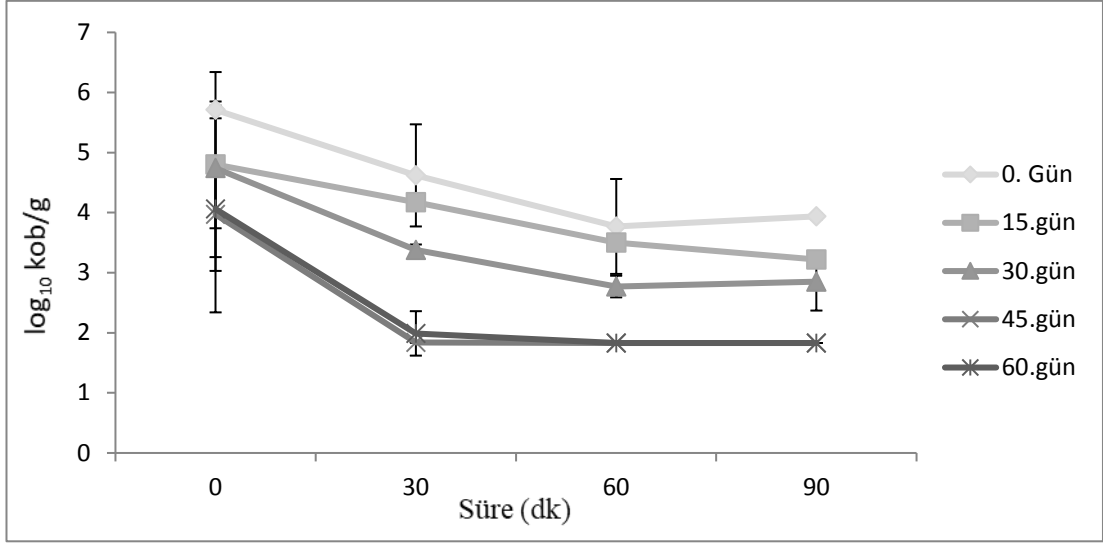
STEC O157 depolamanın 0., 15. ve 30. günlerinde ilk 30 dakikada gerçekleşen canlılık kayıplarından sonra SMS maruziyeti süresince önemli canlılık düşüşleri tespit edilmedi. 45. ve 60. günlerde ilk 30 dakikada ciddi düşüşler belirlendi ve patojen sayısının SMS deneylerinin 60. ve 90. dakikalarında tespit limitinin altında seyrettiği belirlendi. Patojenin asit dayanımının depolama günleri boyunca kademeli olarak azaldığı ve 75.günde yitirildiği tespit edildi (Tablo 4.28, Şekil 4.27).

Tablo 4.28. STEC O157'in Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince SMS Deneylerinde Değişimi (n:3, N6) ( $\log_{10}$  kob/g) ( $R^2$  0,93)

Günler	Zaman (Dakika)			
	0	30	60	90
0	5,71±0,14 <sup>ax</sup>	4,62±0,85 <sup>abx</sup>	3,77±0,79 <sup>bx</sup>	3,94±0,05 <sup>bx</sup>
15	4,80±1,54 <sup>axy</sup>	4,17±0,11 <sup>abx</sup>	3,50±0,09 <sup>bx</sup>	3,22±0,14 <sup>bx</sup>
30	4,74±1,00 <sup>axy</sup>	3,38±0,09 <sup>bx</sup>	2,77±0,18 <sup>bx</sup>	2,85±0,48 <sup>bx</sup>
45	3,97±0,93 <sup>ay</sup>	1,84± 0,002 <sup>by</sup>	<1,84	<1,84
60	4,06±1,72 <sup>ay</sup>	1,99±0,37 <sup>by</sup>	<1,84	<1,84
75	4,08±1,61 <sup>y</sup>	<1,84	<1,84	<1,84

<sup>a,b,c</sup> Satırda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p < 0,05$ )

<sup>x,y,z</sup> Sütunda farklı harflendirmeler istatistiksel olarak önemli değişimleri ifade etmektedir ( $p < 0,05$ )



Şekil 4.27: STEC O157 Canlılığının Grup 2 Sosislerde SMS Deneylerinde Değişimi

Grup 2 sosis örneklerinin SMS deneylerinde O145 ve O26'nın dayanımlarını diğer patojenlere kıyasla daha uzun süreli korunduğunu söylemek mümkündür. Bunun yanı sıra tüm patojen gruplarında Grup 2 sosislerindeki asit dayanımı diğer örneklerle göre daha kuvvetli bulundu. 75. gündeki MAB, LAB ve PB sayılarındaki düşüş eğilimi patojen bakteri popülasyonundaki asit dayanımının azalması ile uyumlu görünmektedir. Metabolitlerin birikimi, besin maddelerinin azalması gibi koşulların tüm bakteri popülasyonlarını olumsuz etkileyerek mevcut sonuçlara yol açmış olduğu düşünülmektedir. Rekabetçi floranın depolama başında oldukça düşük seviyelerde olmasının ve sosis pH'sının depolama süresince asit tolerans cevaplarının gelişebileceği pH'ya yakın olmasının, patojenlerin bu örneklerde hızla direnç kazanmalarına neden olmuş olabileceği düşünülmektedir. Rekabetçi floranın artış gösterdiği depolamanın ilerleyen günlerinde bile patojenlerin sosis ortamındaki canlılıkları ve SMS'na dayanımları etkilenmemiş görünmektedir. Patojenlerin zayıf asitliğe maruziyeti ile gerçekleşen asit adaptasyonu ile *E.coli* bakterilerinin laktik asit gibi LAB metabolitlerine karşı direncinin arttığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Leyer ve ark., aside adapte edilen (pH 5) ve edilmeyen (pH 7) *E.coli* O157:H7 suşlarını pH 5,6'da fermente sosis hamuruna inokule etmişler ve aside adapte suşların oldukça direnç kazanmış olduğunu raporlamışlardır [110]. Öztürk ve Halkman [85], aside adapte (pH 5,5) *E.coli* O157:H7 bakterilerinin adapte edilmeyen suşlara göre refakatçi LAB sayılarının yaklaşık 9 log olduğu sucuk fermantasyonu ve

depolanması sırasında çok daha dayanıklı olduklarını tespit etmişlerdir. *E.coli* asit tolerans cevabının pH 5-6 civarında orta asitlikte şekillendiği düşünülmektedir.

Grup 2 sosislerde pH ve % asitlik sonuçları Tablo 4.29’da gösterilmektedir. Depolama süresince pH ve titrasyon asitliği değişimleri depolama günleri arasında önemsiz bulundu ( $p>0.05$ ).

Tablo 4.29: Grup 2 Sosislerde Depolama Süresince pH ve % Laktik Asit Değişimleri

Analiz	Günler					
	0	15	30	45	60	75
pH	5,18±0,26	5,41±0,17	5,38±0,2	5,38±0,11	5,40±0,13	5,56±0,1
% Laktik Asit	0,62±0,12	0,34±0,14	0,32±0,23	0,26±0,06	0,35±0,15	0,31±0,08

Patojenlerin tüm örneklerde SMS deneylerindeki canlılıkları değerlendirildiğinde gıda ortamına bağlı farklılıklar tespit edilmiştir. STEC O157:H7 tüm matrislerde ve asit denemelerinde en az asit dayanımına sahip serogrup olarak görünmektedir. Bunun yanında STEC O103 Grup 1A ve 1B sosislerinde asit dayanımı en yüksek serogrup iken Grup 2 sosislerinde STEC O26 ve O145 asit dayanımı en yüksek patojen grupları olmuştur. Grup 1A ve 1B verilerinde STEC O103’ün daha rekabetçi bir izlenim verdiği ifade edilmişti. Grup 2 örneklerinde depolama başlangıcında kuvvetli bir rekabet ortamı olmadığından STEC O103’ün rekabetçilik avantajı ile öne çıkamadığı, O26 ve O145’in rekabetçi flora tarafından strese sokulmadan asit dayanımının aktive olması ile bu sonuçların ortaya çıktığı düşünülmektedir. Rekabetçilik avantajı ortadan kalktığında STEC O103’ün asit dayanımının bu serotiplere göre daha zayıf olduğu anlaşılmaktadır. Gıda ortamından bağımsız olarak gerçekleştirilen direk SMS deneylerinin sonuçları da bu sonuçlara paralellik göstermektedir (Tablo 4.2). STEC O157 Grup 2 örneklerinde de en dayanıksız serogrup olarak tespit edilmiş olmasına rağmen, Grup 1A ve Grup 1B’ye göre çok daha iyi asit dayanımı ve canlılık gösterdiği tespit edildi.

Literatürde STEC serotiplerinin sosis ortamında canlılığının ve asit dayanımının izlendiği çalışmalara rastlanmamıştır. Serotiplerin farklı gıda matrislerinde incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda gıda ortamı, suş seçimi gibi değişkenler dolayısıyla sonuçlarda varyasyon gözlenmektedir. Bu tez çalışmasında da aynı üründe (sosis), aynı yöntemler ve aynı suşlar kullanılarak elde

edilen sonuçların değişiklik gösteriyor olması bu patojenlerin yaşamları ve asit dayanımlarının birçok faktörden etkilendiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle literatür verilerindeki varyasyonların doğal olduğu düşünölmektedir [67, 111, 112, 113].

Fermente sosislerde yapılan çalışmalarda *E.coli* canlılığı, etin önceden işlem görmesi, NaCl, nitrit ve laktik asit miktarı, su aktivitesi, pH, starter kültürler ve antimikrobiyal bileşenlerin eklenmesi gibi faktörler ile değişim göstermektedir. Bunların yanı sıra fermantasyon sıcaklığı ve depolama süresi de etkili olmaktadır [103]. Bu tez çalışmasında elde edilen verilerle, emölsifiye sosislerde de özellikle perakende satış noktalarından temin edilen sosislerin LAB, MAB, PB sayıları gibi rekabetçi floradaki, pH'daki ve katkı maddelerindeki farklılıkların sosisteki patojenin yaşam ve asit dayanımındaki değişimlerin oluşmasında etkili olduğu düşünölmektedir.

Rode ve ark., salgınlardan izole edilen *E.coli* izolatlarının fermente sosis üretim koşullarına ve takiben sentetik sindirim sıvılarına dayanımını incelemişlerdir. Fermantasyon prosesine maruz kalan bakterilerin (20°C starter kültür ilave edilmiş 21 gün fermantasyon) kontrol grubuna (4°C'de starter kültür ilave edilmemiş 22 gün yavaş spontan fermantasyon) göre mide asidi dayanımının daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir (pH 3). Araştırmacılar iki matriste de mevcut olan ayrışmamış (disosiye olmamış) laktik asidin, asit stresine katkı sağladığını öne sürmüşlerdir [112]. Mide sıvısı maruziyetini takiben gerçekleştirilen sentetik bağırsak sindiriminde bakteri sayısının önce bir kısım azaldığı daha sonra bakterinin toparlanarak sayısını arttırmaya başladığı tespit edilmiştir. Çalışmada non-O157 STEC'ler ile STEC O157 arasında asit dayanımı farklılığı bulunmadığı tespit edilmiştir. Elbette ki burada asit dayanımı pH 3'te test edilmiş olması bizim çalışmamızdaki en önemli farklılıktır. Bizim çalışmamızdaki SMS sıvısı pH 1,5'a ayarlı olup deney süresince pH 2,5'in üstüne çıkmaması hedef olarak belirlenmiştir. pH'daki küçük farklılıkların bile asit dayanımına etkili olabileceği belirtilmektedir [112]. Bu çalışmada SMS deneylerinde pH'nın 2,5'i aşmamasının hedeflenmesinin nedeni doğal sindirimde mide pH'sının tüketimden sonra kademeli olarak asitlenmesidir.

Naim ve ark., *E.coli* O157:H7 inokule edilerek fermente edilen sosislerin sindirim koşullarına dayanımını incelemiştir. Statik sindirim denemelerinde mide sıvısı ile muamelenin ilk dakikasında pH 3,2 iken 2 saatlik muamelede 4,0'e çıktığını bu sırada patojen sayısının değişime uğramadığını belirtmişlerdir [113]. Takip eden pankreatik sıvı ile muamelede patojenlerin sayılarını önemli ölçüde arttırdıklarını ifade etmişlerdir. Dinamik sindirim denemelerinde mide sıvısının pH'sı 3,6'dan 30 dk'da 3,0'e; 60. dk'da 2,5'e ve 90.dk'da 2,0'ye ayarlanarak kademeli olarak azaltılmıştır. Bu sırada çalışmada kullanılan iki suşun 0,63 log ve 0,69 log kadar sayılarını arttırdığını tespit etmişlerdir. Takip eden pankreatik sıvı muamelesinde suşların üreme yetisinin, öncesinde uygulanan mide sıvısı muamelesinin süresiyle ilişkili olduğunu, 120 dk mide sıvısına maruz kalan patojenlerin pankreatik sıvıda sayılarını arttıramadığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında da asit stresi süresinin uzaması ile patojenlerin dayanımlarının azaldığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Rode ve ark., [112], Naim ve ark.'nın [113], sonuçları ile farklılık gösteren araştırma bulgularını pH farklılığından kaynaklanmış olabileceğini ve pH'daki çok küçük farklılığın bile asit dayanımında farklılık yaratabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz sonuçlar bu düşüncüyü desteklemektedir. Grup 1A, 1B ve Grup 2 sosislerin depolama başlangıç pH'sı ortalamaları sırasıyla  $6,36 \pm 0,32$ ,  $6,74 \pm 0,02$  ve  $5,18 \pm 0,26$  şeklindedir. Yine Rode ve ark., [112], bahsettiği ayrışmamış laktik asidin mide asidinde yıkımlanmaya olan katkısından burada da bahsetmek mümkün görünmektedir. Matriste bulunan laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asidin depolamanın sonlarına doğru birikerek asit yıkımlanmasına katkı sağlamış olabileceği de düşünülmektedir.

Asit adaptasyonun gerçekleştirilmesi veya asit dayanımının artırılması için bakterinin maruz kaldığı organik asidin cinsi de önemli olmaktadır. Uljas ve Ingham [114], *E.coli* O157:H7 hücrelerinin asidik içeceklerde soğukta muhafazasında hayatta kalmasının, asidin cinsi ile bağlantısı olmamasına rağmen takip eden SMS maruziyetinde bu asit cinsinin önemli tesiri olduğunu raporlamışlardır. Özellikle laktik asit maruziyetinin SMS deneylerinde bakterinin hassasiyetini arttırdığını belirtmişlerdir. HCl gibi tamamen ayrışmış asitler organik asitlere göre daha az inhibisyon tesiri göstermektedir. Fermente sosislerde LAB tarafından üretilen laktik asidin düşük pH dolayısıyla ayrışmamış formu artmakta dolayısıyla bakteriyel inhibisyon da artmaktadır [103]. Grup 1B sosislerde LAB sayısı en yüksek olan C

marka sosislerde ortamdaki laktik asidin inhibisyona katkı sağlayan faktörlerden olabileceği düşünülmektedir.

Kim ve ark., *E.coli* O157:H7 ve non-O157 STEC'lerin ananas suyunda adaptasyonu sonunda SMS'na dayanımını ve asit dayanım genlerinin (*rpoS*, *gadA*, *adiA*) ekspresyonunu incelemiştir [69]. pH 3,8'de gerçekleştirilen adaptasyon işleminde 4°C ve 20°C olmak üzere iki ayrı sıcaklık kullanılmıştır. Ananas suyunda 20°C'de adaptasyonu gerçekleştirilen bakterilerin 4°C'dekilere göre daha zayıf asit dayanımı gösterdiği, *rpoS* geni transkripsiyonu 4°C'de daha fazla gerçekleştiği tespit edilmiştir. Adaptasyonun takip eden SMS deneylerinde dayanımı arttırdığı belirtilmiştir. STEC suşlarının meyve suyunda soğuk depolamada asit dayanımlarının arttığını gösteren başka çalışmalar da mevcuttur [68,72]. Bergholz ve Whittam, elma suyunda (pH 3,5) 4°C'de 24 saat aside adapte edilen *E.coli* O157:H7 O26:H11 ve O111:H8'in mide asitliğine 22°C'de aside adapte edilen kültürlerden daha fazla dayanım gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca STEC O26 ve O111'in O157'ye göre asit dayanımlarının daha düşük olduğunu raporlamışlardır. Bu çalışmada mide asidi denemelerinde bebek maması ile kültürler mide sistemine alınmıştır. Asit adaptasyonunun bakterilerin asit dayanımını arttırdığı belirtilmiştir [68]. Bu çalışmada Grup 2 sosislerde mevcut pH'nın düşük olması dolayısıyla soğukta depolama sırasında bakterilerinin aside adapte olmuş olabilecekleri ve dolayısıyla takip eden asit stresine (SMS) bu nedenle daha yüksek dayanım göstermiş olabilecekleri düşünülmektedir.

Molina ve ark., O157 ve non-O157 genotipleri arasında asetik ve sitrik aside karşı hassasiyetlerin varyasyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Katoaka ve ark., [85] sodyum bisüfit ve sodyum benzoat içeren limon sularında (pH2,5) O157:H7 ve non-O157 suşlarının (O26, O45, O103, O111, O121, O145) 22°C'de 72 saat sonunda >6log inaktivasyonunun gerçekleştiğini ve O157 ile non-O157 STEC'ler arasında fark tespit edilemediğini belirtmişlerdir [84].

Bahsedilen çalışmalarla bu çalışmanın bulguları arasındaki farklılıklar asit dayanımının test edildiği pH ve organik asit profilindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Carey ve ark., marula kontamine edilen *E.coli* O157:H7'nin 4°C'de depolamada *rpoS* geninin bir kısım arttığını ve 15°C'de daha uzun depolamada ise

bu genin ekspresyonunun azaldığını raporlamışlardır [115]. White-Ziegler ve ark., *E.coli* K-12'nin 23°C'de inkübe edilmesiyle 37°C'de inkübe edilmesinden 2-3 kat daha fazla rpoS geni transkripsiyonu gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir [116].

Genel olarak stres geninin düşük sıcaklıklarda tetiklendiğini ifade edilmektedir [69,70,72]. Bunun yanında açlık, strese maruz kalma veya hücrelerin durağan faza geçişi gibi durumlarda RpoS sigma faktörünün tetiklendiği (indüklendiği) dolayısıyla takip eden başka streslere dayanım kazandırabileceği söylenebilir [117,118]. Araştırmacılar soğuk stresi proteinlerin sentezlenmesi ile asit stresine karşı çapraz koruma gelişmiş olabileceğini belirtmektedir [69, 119]. *E.coli* stres adaptasyonun soğukta saklanan ürünlerde daha kolay gelişebileceği görülmektedir. Asit adaptasyonunun geliştikten sonra soğukta daha uzun süreli korunduğu düşünülmektedir [120]. Grup 2 sosislerinde elde edilen sonuçlara soğukta depolamanın da katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Asit dayanımının bu matriste büyük ölçüde pH'ya bağlı olarak daha güçlü olduğu düşünülüyorsa da soğukta depolama bu dayanımın depolama süresince korunmasına katkı sağlamış olabilir.

AR2 sistemi (glutamat dekarboksilaz) *E.coli* bakterisini midenin asidik koşullardan korumada en etkili sistem olduğu düşünülmektedir [121]. Kim ve ark., yaptıkları çalışmada O157:H7 ve O103:H2'nin 4°C'de ananas suyuna adaptasyonunda gadA geni transkripsiyonunun diğer suşlara göre daha fazla olduğu ve bu bakterilerin SMS dayanımlarının daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir [69]. Araştırmacılar AR gen transkripsiyonunun STEC serotipleri arasında oldukça farklılık gösterdiğini ve bu gen transkripsiyonunun SMS maruziyette hayatta kalma oranlarıyla tüm suşlarda korelasyon göstermediğini belirtmişler ve SMS'da hayatta kalmada başka faktörlerin de rol oynadığı sonucuna varmışlardır. Bergholz ve Whittam, yaptıkları çalışmada AR2 genleri (gadA, gadB) O157 STEC'de non-O157'lere (O26, O111) göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir [67].

Gıdaların mide pH'sını tamponladığı bilinen bir gerçektir. Gıdanın tüketilmesiyle mide pH'sı 3-4,5 değerlerine tamponlanabilmektedir [122]. Bu etki gıda bileşenlerinin mide asidi ile interaksyonu sonucunda ve proteinlerin pepsin ile hidrolizinde oluşan aminler sayesinde gerçekleşmektedir. Mide sindiriminin ilk safhalarında pH tamponlanmakta daha sonra asit salınımı ile 2 saat sonunda 2,0

civarına düşürülmektedir. Ancak sindirim sırasında yaklaşık 30. dakikadan itibaren mide içeriği kademeli olarak bağırsaklara aktarılması başlamaktadır [113].

Bu çalışmada yapılan SMS deneylerinde mide sıvısının pH'sı 90 dakika sonunda 2,5'i aşmamıştır. Ancak yapılan ön denemeler sırasında sosisin mide pH'sını oldukça tamponladığı tespit edilmiştir. Gerçek bir tüketim söz konusu olduğunda ilk etapta mide pH'sındaki bu tamponlanma dolayısıyla patojen canlılıklarının daha yüksek olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Mide pH'sı gıda tüketiminden hemen sonra tırmanmakta ve konakçıya özgü bazı faktörler, yaş, gıdanın tamponlama kapasitesi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişen sürelerde açlık pH'sına dönmektedir [123]. Genç yetişkinlerde gıda tüketiminden sonra mide pH'sı 2 saat içinde pH 2'ye dönerken bazı yaşlı bireylerde 4 saat sonunda bile pH'nın bu değere düşmediği belirtilmiştir. Yaşlı bireylerde mide pH'sının 2'ye dönmesi genç bireylere göre daha yavaş gerçekleştiği belirtilen çalışmada, genç bireylerde gıda tüketiminden sonra ortalama 42 dakikada pH 3'e dönen mide pH'sının yaşlı bireylerde neredeyse 2 katı sürede (89 dakika) bu değere ulaştığı belirtilmiştir [124].

Patojen bakterilerin tüketim esnasında mide pH'sında meydana gelen tamponlama sonucunda bile mide asidine direnç kazanabilecekleri de belirtilmektedir. Rowe ve Kirk, *E.coli* bakterisinin çapraz koruma gelişimini araştırdıkları çalışmada *E.coli* stres adaptasyonunun 15 dakika kadar kısa sürede bile gerçekleşebildiğini belirtilmiştir [125]. De Jonge ve ark., insan midesindeki pH değişimlerinin taklit edildiği çalışmalarında asit hassasiyeti olan *E.coli* O157:H7 suşunun bile 17 dakikada asit direnci kazandıklarını raporlamışlardır [123].

Sentetik mide sıvısı ile yapılan çalışmalarda gıdanın koruyucu etkisi ayrı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Statik mide sindirimi denemelerinde bile bakteri gıda ile mide sıvısına girdiğinde, bakteriyel canlılığın daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Waterman ve Small, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni*, ve *Vibrio cholerae* üzerinde yaptıkları çalışmada HCl asit ile asitlendirilmiş (pH 2,5) Luria-Bertani broth besiyerinde sığır kıymasının patojenleri koruyucu bir etkisi olduğunu raporlamışlardır. Araştırmacılar yüksek protein içerikli gıdaların bakterileri gastrik asitlikten koruyucu etkisi olabileceğini belirtmişlerdir [70]. Çalışma sonuçlarının kıymanın pH'yı tamponlamasına bağlı



olabileceğini belirtmişlerse de bu karmaşık mekanizmanın pH'ya bağlı olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Gönüllülerden açlık mide sıvılarının toplandığı bir çalışmada  $10^3$  kob/ml düzeyinde enteropatojenik *E. coli*, *Shigella flexneri*, ve *Salmonella* bakterileri bu mide sıvılarında oda sıcaklığında hayatta kalamazken gıda tüketimi sonrası alınan mide sıvılarında aynı süre sonunda yaklaşık 2-4 kat daha fazla canlılık olduğu belirlenmiştir [126]. Biftek ve tost tüketiminden 20 dakika sonra alınan mide sıvılarının pH'sı da 1,5'e ayarlanmış olduğundan burada pH dışındaki başka faktörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir. Gıdanın koruyucu etkisinin hangi mekanizma ile gerçekleştiği açıklanamamış ve tartışmaya açık bir konu olsa da protein içeriği yüksek gıdalarda proteinlerin hidrolizi sonucunda ortaya çıkan azotlu bileşikler ile asit dayanımı mekanizmalarının tetiklenebileceği düşünülebilir. Ancak bu tez çalışmasında gıdanın tek başına koruyucu bir etki sağladığına dair herhangi bir veri elde edilmemiştir.

Hücrelerin çeşitli streslerle yaralandığı ancak canlılıklarının yitirmediği ve klasik metodlarla canlandırılmadığı bir durum söz konusu olabilmektedir. Bu durum canlı ancak kültürlenemeyen (Viable but non-culturable, VBNC) şeklinde adlandırılmaktadır. VBNC durumuna geçen bakteriyel hücreler standart besiyerlerinde kültürlenemezken yavaş gen transkripsiyonu, solunum gibi metabolik aktivitelerini ve membran bütünlüğünü korumaktadırlar. Bu formda hücreler düşük metabolik aktivite göstermekte ve yeniden canlandırıldıklarında kültürlenebilir hale gelmektedir [127]. Yaron ve Matthews, *stx1* ve 16S rRNA gibi genlerin kültürlenemeyen *E.coli* O157:H7 hücrelerinde eksprese edildiğini göstermişlerdir [128]. *E.coli* bakterilerinin subletal çevresel streslerde VBNC forma geçerek hayatta kaldıklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [129,130]. Berry ve ark., yaptıkları çalışmada *E.coli* O157:H7 hücrelerinin non-O157 hücrelerine göre daha fazla yaralandığını belirtmişlerdir [89].

Bu tez çalışmasında VBNC durumdaki hücrelerin tespiti için bir analiz yapılmamıştır ve SMS deneylerinde canlılık tespit edilmeyen durumlarda hücrelerin VBNC forma geçmediklerini söylemek mümkün değildir. O157:H7'nin daha fazla yaralandığı tespit edilen çalışma ışığında bizim denemelerimizde de bu tip bir gerçeklik olabileceği akla gelmektedir. *E.coli* O157:H7'nin doğal ortamlarda asit dayanımının non-O157 serotiplerine göre daha fazla olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Bizim sonuçlarımızda bu verilerin tam aksini elde etmiş

olmamızın bu hücrelerin diğer serotiplere göre daha fazla yaralanmasından kaynaklı olabileceği akla gelebilir. Ancak sosis matrisindeki canlılık oranlarınınabakıldığında da O157:H7 en zayıf grup olmaktadır. Dolayısıyla burada daha önce bahsedilen başka faktörlerden kaynaklı olarak bu patojenlerin diğer serotiplere kıyasla daha fazla etkilendiği de görülmektedir. Bunların yanı sıra VBNC durumdaki hücrelerin mideden çıktıktan sonra sindirimin diğer kısımlarındaki streslere dayanarak yeniden aktivite kazanabilecekleri konusu tartışmalıdır.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Shigatoksijenik E.coli suşları O157:H7 ve “big six non-O157” serogruplarından O103, O26 ve O145’in sosislerin depolanması sırasında canlılığı ve sentetik mide sıvısına dayanımları incelenmiştir. Çalışma ile birçok gıda kaynaklı salgına ve ciddi rahatsızlıklara neden olmuş STEC serogruplarının, canlılığına ve asit dayanımlarına etki eden faktörlerin sosis ortamında incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler sayesinde, efektif dozlarının oldukça düşük olabildiği bilinen bu patojenlerin sosis gibi soğuk olarak da tüketilmekte olan bir gıdaya bulaşması durumunda oluşabilecek risklerin değerlendirilmesi ve gelecek çalışmalara ön bilgiler sağlanması hedeflenmiştir. Çalışma sonuçları ve öneriler aşağıda özetlenmektedir.

- Rekabetçi floranın yüksek seviyede olmasının, STEC patojenlerinin sosis ortamında canlılığına ve asit dayanımına olumsuz etki ettiği görülmektedir. Özellikle de bu florada mevcut olan LAB seviyelerinin yüksek olmasının inhibisyona ve asit hassasiyetine daha çok katkı sağladığı düşünülmektedir. Öte yandan depolama başında rekabetçi flora seviyelerinin düşük olduğu ve gıda pH’sının patojenlerin asit tolerans cevapları gelişimine olanak sağlayan pH seviyelerine (pH 5,5) yakın olduğu sosis örneklerinde, depolamanın ilerleyen günlerinde rekabetçi floradaki artışın olumsuz bir etki oluşturmadığı görülmüştür. Dolayısı ile rakabetçi flora ve laktik asit bakterilerinin oluşturduğu stres koşullarının, patojenlerin mevcut gıda ortamına alışmaları ve asit direnci kazanmalarından önce şekillenmiş olması patojenler üzerinde olumsuz bir etki yaratırken; patojenlerin gıda ortamına alışıp direnç kazanmalarından sonra şekillenmesinin herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı görülmektedir.
- Çalışmada tüm örnek gruplarında canlılığı ve asit dayanımı en düşük serogrup O157 olarak tespit edilmiş ancak, gruplar arasında dayanımı en yüksek non-O157 serogrupları arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Dolayısı ile gıda ortamındaki mikrobiyolojik faktör farklılıklarının STEC serogruplarının dayanımlarına önemli etkisi bulunduğunu söylemek mümkün olmaktadır.

- Non-O157 serogruplarından STEC O103 'ün rekabetçi floranın yüksek olduğu örneklerdeki canlılığının diğer serogruplara göre daha yüksek olması, bu patojenin çalışılan diğer serogruplara göre daha rekabetçi olabileceğini düşündürmektedir. Rekabetçi flora seviyelerinin düşük olduğu sosislerde STEC O103'ün, SMS'da canlılığının diğer serogruplara göre daha düşük olması ve direk SMS denemelerinin de bu sonuçlara paralellik göstermesi bu patojenin daha rekabetçi olabileceği fikrini destekler görünmektedir.
- Literatürdeki çalışmaların kıyaslanmasında, çalışmalardaki metodolojik farklılıklar sorun oluşturmaktadır. Asit dayanımı ile ilgili analizlerin sonuçları kullanılan asidülantın ve gıda ortamının pH'sı ile değişim göstermektedir. pH'daki küçük farklılıklar bile canlılık oranlarında farklı sonuçların alınmasına neden olabilmektedir. Patojenlerin asit tolerans cevaplarının şekillendiği orta asitlikteki ortamlarda, asit dayanımının adaptasyon sayesinde arttığı ve rekabetçi flora, asit stresi gibi takip eden streslere dayanımı arttırdığı düşünülmektedir. Çalışmada Grup 2 örneklerinde elde edilen sonuçlar ile bu görüş korelasyon göstermektedir. Ancak çalışma sonuçlarından, daha düşük pH'lı ortamlarda asit stresi dolayısıyla takip eden streslere dayanımın azaldığı görülmektedir. pH'nın emülsüfiye sosislere göre daha düşük olduğu fermente sosislerle yapılan çalışmalara bakıldığında da patojenlerin dayanımının, önceden aside adapte edilmeleri ile arttığı görülmektedir. Bunun yanı sıra pH'nın nötrale yakın olduğu, *E.coli*'nin çevresel stres sinyallerini almadığı ve/veya asit stresinin bulunmadığı gıda ortamlarında düşük ATR sergileyebilecekleri belirtilmektedir.
- Asit dayanımı ile ilgili çalışmaların birçoğu laboratuvar besiyerlerinde gerçekleştirilmiş olup gıda ortamındaki birçok değişkenin hesaba katılmadığını belirtmek gereklidir. Elbette ki bu çalışmalar patojenlerin asit dayanım kabiliyetleri hakkında değerli verilerin elde edilmesine katkı sağlamaktadır. Ancak mide sıvısı ortamında söz konusu gıdaya özgü reaksiyonların gerçekleşebileceği, bu gıdanın bileşiminin, katkı maddelerinin ve depolama sırasındaki rekabetçi floranın asit dayanımlarına etkileri olacağı hesaba katılmalıdır. *E.coli*

bakterilerinin önceden aside adapte edilerek canlılıklarının kıyaslandığı çalışmalar bile farklılık göstermektedir. Bu çalışmalarda elde edilen verilerin farklılığı, değişik gıda sistemleri, depolama sıcaklıkları ve inokulum seçiminden olabilmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin de Grup 1A, 1B ve Grup 2 sosislerde farklılık göstermesi bu patojenlerin benzer gıda matrisinde bile farklı dayanımlara sahip olduğunun bir kanıtı olmaktadır. Rekabetçi flora seviyesi ve cinsi, ortam pH'sı ve katkı maddeleri gibi faktörün bu farklılıkların gözlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Objektif bir kanıya varabilmek için asit dayanımlarının incelendiği çalışmaların aynı serogrupta birçok suşu içeren ve sentetik besiyerlerinin yanı sıra, risk teşkil eden gerçek gıda ortamlarında yapılan çalışmalar olması önem taşımaktadır. Laboratuvar ortamlarında yapılan çalışmalarda genellikle patojenler zengin besin ortamlarında ve rekabetçi flora gibi streslerden uzak olarak geliştirilmektedir. Ancak gıda ortamlarında patojen bakterilerin stres altında buldukları, bu stresler sayesinde stres dayanımının artabileceği ve/veya çapraz korumaya yol açabileceği dolayısı ile tahmin edilenden daha büyük risk unsuru oluşturabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Elbette bunun yanında gıda ortamındaki streslerin, patojenlerin dayanımlarına olumsuz etki ederek besiyerlerinde test edilen dayanımlarından daha düşük dayanım sergilemelerine de neden olabildiği görülmektedir.

- Çalışmada elde edilen veriler ışığında, sosisin STEC'ler ile bulaşması durumunda ortam değişkenlerine bağlı olarak risk teşkil edebilecek bir gıda olduğu görülmektedir. Bu gıdanın ikinci bir ısıl işlem uygulanmadan soğuk salatalarda tüketilmesi riskli görünmektedir.
- STEC serotiplerinin canlılıkları ve asit dayanımları suş farklılıkları, ürün pH'sı, katkı maddeleri ve rekabetçi flora seviyesi gibi faktörler ile etkilenmektedir. Bu etkilerin hangi ölçüde stres dayanımına katkı sağladığı veya arttırdığı değişkenlerin tek tek ele alınarak yapılacak olan daha ayrıntılı çalışmalar ile ortaya koyulmalıdır.
- Literatürdeki çalışmalar genel olarak STEC O157'ye odaklanmış görünmektedir ve non-O157 serotiplerinin O157'ye benzer veya daha

zayıf stres cevaplarına sahip olduğu fikri yaygın görünmektedir. Ancak, 2011'de Almanya'da gerçekleşen STEC O104 salgını bazı non-O157 serotiplerinin oldukça büyük risk teşkil edebileceğini göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler de non-O157 serotiplerinin, sosis ortamında depolama boyunca O157'den daha dayanıklı olduğunu ve takip eden asit stresine daha yüksek dayanım gösterdiğini ortaya koymuştur. Araştırmalar STEC O157 ve non-O157'lerin farklı evrimsel geçmişleri olduğunu göstermektedir. Non-O157 STEC'lerin O157'ye benzer şekilde stres cevaplarının olduğu varsayımı ile hareket edilmemeli, bu patojenlerin gıdalardaki stres faktörlerine karşı cevapları ve konakçısı ile ilişkileri ayrıntılı çalışmalar ile incelenmelidir. STEC enfeksiyonlarında non-O157 STEC'lerin daha büyük bir payı olduğu düşünöldüğünde gelecek çalışmaların bu patojenlerin davranışlarını daha iyi çözümleyici, ayrıntılı ve peşin yargılardan uzak olması gerekliliği daha da önem kazanmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Conrad C.C., Stanford K., McAllister T.A., Thomas J., Reuter T. Further development of sample preparation and detection methods for O157 and the top 6 non-O157 STEC serogroups in cattle feces *Journal of Microbiol. Methods*, 2014, 22–30.
2. Hussein, H.S. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science*, 2007, 85 E63–E72.
3. CDC (Centers For Disease Control And Prevention). Shiga Toxin-Producing *E. coli* & Food Safety. Son Erişim: Mayıs 2018  
<https://www.foodsafety.gov/blog/2018/05/shiga-toxin-producing-ecoli-food-safety.html>
4. Chatzikiyriakidou, K. Behavior of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Beef and Beef Model Systems under Cold and Acid Stress. University of Wisconsin-Madison, Food Science, 2014, s 131. (Doktora Tezi).
5. USDA Food Safety and Inspection Service (FSIS). Detection and isolation of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains (STEC) from meat products. Microbiological Laboratory Guidebook, version 5B.00. USDA, Food Safety Inspection Service, Washington, DC, 2010.
6. Arslan A. Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi. Medipres Yayıncılık, Malatya, 2002.
7. Güngör E., Gökoğlu N. Determination of microbial contamination sources at a Frankfurter sausage processing line, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.*, 2010, 34, 53-59.
8. Afshin J., Reza Z., Saeid S. Microbiological Study of Cocktail Sausage During Shelf Life. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2011, 7(6), 1056-1056.
9. Mahami T., Amafu-dey H., Odonkor S.,T. Microbial Food Safety Risk: Cooked And Smoked Sausages As A Potential Source, *IJBPAS*, 2012, 1: 99-107.
10. Samaha I.A., Nossair M.A., Kassem A.A. Microbial Evaluation of Heat Treated Meat Products, 2016, 49:153-159.

11. Donnenberg, M. S. *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen. Elsevier Science Edition, Academic Press, San Diego, California, 2002.
12. Azizoglu R. O. Influence of Antibiotic, Acid, and Salt Stress on Resistance of *Escherichia coli* O157:H7. North Carolina State University, Food Science, North Carolina, 2005, 137s. (Yüksek Lisans Tezi).
13. Rivas L., Mellor G.E., Gobius K., Fegan N. Detection and Typing Strategies for Pathogenic *Escherichia coli*, Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition, ABD, 2015.
14. Eslava C., Villaseca J., Hernandez U., Cravioto A. International Handbook Of Foodborne Pathogens. Ed: Marianne D. Miliotis, Jeffrey W. Bier. Marcel Dekker Inc, ABD, 2003.
15. Ray, B., Bhunia, A. Fundamental Food Microbiology. Fifth Edition. Taylor & Francis Group, CRC Press, ABD, 2014.
16. Bumbaugh A.C., Lacher D.W. Gene Acquisition and Loss in the Phylogenetic Lineages of the Invasive *Escherichia coli*. In Population Genetics of Bacteria: A Tribute to Thomas S. Whittam. Ed: Seth T. Walk and Peter C. H. Feng, ASM Press, Washington, ABD, 2011, 69-89.
17. Vasan, A. Thermal tolerance characteristics of non-O157 Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* in meat systems. University of Wisconsin, Madison, 2014, 188s. (Doktora Tezi).
18. Nørrung B., Andersen, J.K., Buncic S. Safety of Meat and Processed Meat. Food Microbiology And Food Safety Series. Ed: Fidel Toldrá, Series Ed: Michael P. Doyle, Springer Science Business Media, 2009.
19. Kaur, H. Identification Of Shiga Toxin –Producing *Escherichia Coli* In Beef Cattle Of Northeast – Arkansas Using Cultural Methods. Arkansas State University, 2013, 84 s. (Yüksek lisans Tezi).
20. Omerovic M, Müştak H.K., Kaya B.İ. *Escherichia coli* Patotiplerinin Virülens Faktörleri. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 2017, 28 (1): 1-6.
21. CDC (Centers For Disease Control And Prevention). *E.coli* General Information. Son erişim tarihi: Kasım 2018, <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>



22. CFSPH-The Center for Food Security and Public Health. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other *E. coli* causing hemolytic uremic syndrome. 2016. Son Erişim Mart 2018. [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/e\\_coli.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/e_coli.pdf)
23. Belanger L., Garenaux A., Harel J., Boulianne M., Nadeau E., Dozois C.M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiology*, 2011, 62(1):1–10.
24. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiology*, 2004, 2(2):123–140.
25. Nataro J. P., Kaper J. B.. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, 11, 142–201.
26. Donnenberg, M. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis, Second Edition. Elsevier Inc., Uk, 2013.
27. Web Sitesi. Son Erişim Mart 2018. <https://www.nzgeo.com/stories/horizontal-gene-transfer/>
28. Janda J. M., Abbott S. L. *Practical Handbook Of Microbiology*. Ed: Emanuel Goldman, Lorrence H Green Third Edition, CRC Press Taylor & Francis Group, ABD, 2015, 307-317.
29. Jay, J. M. *Modern Food Microbiology*, Sixth Edition. Aspen Publishers, Inc, ABD, 2000, 531-543.
30. Modimola, M. S. Investigating The Effect That Changes pH Of The Stomach Have On The Survival of Pathogenic *Escherichia coli* Using Simulated Gastric fluid. University of Johannesburg, 2015, s. 113. (Yüksek Lisans Tezi).
31. Gyles, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Science*, 2007.85: E45–E62.
32. Erkan M.E., Vural A., Güran H.Ş. Diyarbakır örgü peynirinde aflatoksin M1 ile Verotoksin 1 ve 2 varlığının araştırılması. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2009, 1(1): 19-25.
33. Çelik G. Yoğurdun Yapımı Ve Muhafazası Sırasında Shiga Toksin Üreten *Escherichia Coli* (STEC) Serogruplarının Yaşamı. Tunceli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tunceli, 2016, 52s. (Yüksek Lisans Tezi).

34. Scheutz, F. Taxonomy meets public health: the case of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Microbiol Spectrum. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing *E. Coli*. Ed: Sperandio, V., Hovde C.,J. Washington, DC: ASM Press, 2014.
35. Breckenridge, R.T.E. Seasonal Prevalence of Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli* On Beef Cattle Farms In eastern Arkansas. Arkansas State University, 2015, 43s. (Yüksek Lisans Tezi).
36. Karmali M.A., Mascarenhas S., Shen K., Ziebell S., Johnson R., Reid-Smith J. Isaac-Renton C.ve ark. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41:4930–4940.
37. Girardeau J.P., Dalmaso A., Bertin Y., Ducrot C., Bord S., Livrelli V., Vernozy-Rozand C., Martin C. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 34:6098–6100.
38. Frank C., Werber D., Cramer J.P., Askar M., Faber M., an der Heiden M., Bernard H.,ve ark. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. The New England Journal of Medicine, 2011, 365, 1771–1780.
39. Rasko, D.A., Webster, D.R., Sahl, J.W., Bashir A., Boisen N., Scheutz F., Paxinos E.E., ve ark. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. The New England Journal of Medicine, 2011, 365, 725–729.
40. Campbell A., Schneider S.J., Song B. Lambdoid phages as elements of bacterial genomes (integrase/phage21/*Escherichia coli* K-12/icd gene). Genetica, 1992, 86, 259–267.
41. Trofa A.F., Ueno-Olsen H., Oiwa R., Yoshikawa M. Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. Clinical Infectious Diseases, 1999, 29, 1303–1306.
42. Bolton D. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. Foodborne Pathogenic Disease, 2011, 8:350-365.

43. Kroj A., Hauser E., Schmidt H. Comparison of net growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroups O26, O103 and O157 in ground meat at different temperatures. *European Food Research and Technology*, 2014, 238:163-168.
44. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17:7-15.
45. Rowe M.T., Kirk R. An investigation into the phenomenon of cross-protection in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 1999, 16:157-164.
46. Chung H.J., Bang W., Drake M.A. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006, 5:52-83
47. Gahan C.G.M., Hill C. Relationship between stress adaptation and virulence in foodborne pathogenic bacteria. In: *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, Ed: Yousef A.E., Juneja V.K. CRC Press, New York, 2003, s. 213-235.
48. Beales N. Adaptation of microorganisms to cold temperature, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2004, 3:1-20.
49. Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski, Foster JW. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(14):4097-104.
50. Kanjee U., Houry W.A. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 2013, 67: 65-81.
51. Lu P., Ma D., Chen Y., Guo Y., Chen G.Q., Deng H., Shi Y. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia. *Cell Research*, 2013, 23: 635-644.
52. Gabriel, A. A. Fruit Juice Processing: Addressing Consumer Demands for Safety and Quality, In *Microbial Food Safety and Preservation Techniques*, Ed: V. Ravishankar Rai, Jamuna A. Bai, CRC Press Taylor & Francis Groups, 2015, s. 33-46.
53. CDC, Centers For Disease Control and Prevention. 2018b. FoodNet 2017 Preliminary Data. Son Erişim: Kasım 2018 <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/prelim-data-intro-2017.html>

54. CDC, Centers For Disease Control and Prevention. Reports of Selected *E. coli* Outbreak Investigations. Son Erişim: Kasım 2018  
<https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>
55. Brown C. A., Harmon B. G., Zhao T., Doyle M.P. Healthy Animals as Carriers of STEC. In: Verocytotoxigenic *E. Coli*, Ed:Geraldine Duffy,Patricia Garvey,David A. McDowell, Food & Nutrition Press, Inc., ABD, 2001, s. 263- 278.
56. National Cattlemen’s Beef Association. Blue ribbon task force – Dry fermented sausage and *E. coli* O157:H7. 1996.[http://www.beefissuesquarterly.com/CMDocs/BeefResearch/Safety\\_Meeting\\_Exec\\_Summaries/1996\\_dry\\_fermented\\_sausage.pdf](http://www.beefissuesquarterly.com/CMDocs/BeefResearch/Safety_Meeting_Exec_Summaries/1996_dry_fermented_sausage.pdf).
57. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. FSIS guidance on safe cooking of non-intact meat chops, roasts, and steaks. 2009.  
<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bb25d746-dcb0-4d1b-8833-c4bf1ceb1140/5-log-Temperature-Time-Table-Salmonella.pdf?MOD=AJPERES>
58. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products. Federal Register,2011, 76:58157–58165.
59. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products. Federal Register,2012, 77:31975–31981
60. Öztan, A. Et Bilimi ve Teknolojisi (7. Basım). Ankara: TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Yayınları, 2010.
61. Sezer Ç., Ögün M., Güven A. Salam ve sosislerin bazı kimyasal özelliklerinin incelenmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,2013, 19(1):69-72.
62. Smith J.L. The role of gastric acid in preventing food-borne disease and how bacteria overcome acid conditions. Journal of Food Protection, 2003, 66:1292–1303.
63. Bolghari N. Analysis of the Microbial Load and the Amount of Acryl Amide in Heated Sausages Using Microbiological Methods and HPLC Chromatography in Gilan Province of Iran, Research Journal of Applied Sciences, 2016, 11(7)523-529.

64. Oteiza J.M., Chinen I., Miliwebsky E., Rivas M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas), *Food Microbiology*, 2006, 23, 283–288.
65. Yuk H.G., Marshall D.L. Adaptation of *Escherichia coli* O157 : H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70: 3500–3505.
66. Lin J., Smith M.P., Chapin K.C., Baik H.S., Bennett G.N., Foster J.W. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62:3094-3100.
67. Bergholz T.M., Wittam T.S. Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment”, *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102, 352–362.
68. Yuk, H., G., Jo, S., C., Seo, H., K., Park, S., M., Lee, S., C. Effect of storage in juice with or without pulp and/or calcium lactate on the subsequent survival of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 123:198–203.
69. Kim G.H., Fratamico P., Breidt F., Oh D.-H. Survival and expression of acid resistance genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* acid adapted in pineapple juice and exposed to synthetic gastric fluid. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121, 1416-1426.
70. Waterman S.R., Small P.L.C. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64:3882–6.
71. Lin J., Lee I.S., Grey J., Slonczwski J.L., Foster J.W. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177:4097–104.
72. Han Y., Linton R. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in strawberry juice and acidified media at different pH values and temperatures, *Journal of Food Protection*, 2004, 67: 2443–2449.
73. BAM (Bacteriological Analytical Manual), 2017a. “Chapter 3: Aerobic Plate Count”

Son erişim tarihi: 2 Mart

- 2017<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
74. BAM (Bacteriological Analytical Manual), 2017b. Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Son erişim tarihi: 2 Mart 2017. <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm>
75. BAM (Bacteriological Analytical Manual), 2018. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Son Erişim: Mart 2018
76. Silva N., Hiromitaniwaki M., Amstalden Junqueira V. C., Arruda Silveira N., Nascimento M., Gomes R. Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual. CRC Press, New York, ABD, 151-165.
77. Dikici A., Koluman A., Çalıcıoğlu M. Comparison of effects of mild heat combined with lactic acid on Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7, O103, O111, O145 and O26 inoculated to spinach and soybean sprout. Food Control, 2015, 50:184-189.
78. Beumer R.R., de Vries J., Rombouts F.M. Campylobacter jejuni non-culturable coccoid cells. Int J Food Microbiol, 1992, 15:153–163
79. AOAC. Official Methods of Analyses, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 2000.
80. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Et ve Et Ürünleri Analizleri. Ankara, 2013.
81. S.A.S. 1999. Statistical analysis system Version 6.1. Cary, Nort Caroline, USA: S.A.S. Institute.
82. Price S.B., Wright J.C., DeGraves F.J., Castanie-Cornet M., Foster J.W. Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. Applied Environmental Microbiology, 2004, 70:4792–4799.
83. Montet M.P., Jamet E., Ganet S., Dizin M., Miszezycha S., Dunie`re L., Thevenot D., Vernozy-Rozand C. Growth and survival of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains during the manufacture and ripening of Camembert cheese. International Journal of Microbiology, 2009, 653481.
84. Molina P.M., Parma A.E., Sanz M.E. Survival in acidic and alcoholic medium of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina. BMC Microbiology, 2003, 3:17.

85. Öztürk F, Halkman A. Determination of the survival levels of acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 in sucuk (Turkish-type fermented sausage). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 2015, 39: 485-492.
86. Benjamin M.M., Datta A. R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 1995, 61: 1669–1672.
87. Carter M.Q., Louie J.W., Fagerquist C.K., Sultan O., Miller W.G., Mandrell R.E. Evolutionary silence of the acid chaperone protein HdeB in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Applied Environmental Microbiology*, 2012, 78:1004–1014
88. Large T.M., Walk S.T., Whittam T.S. Variation in acid resistance among Shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 2005, 71:2493–2500.
89. Berry E.D., Barkocy-Gallagher G.A., Siragusa G.R. Stationary-phase acid resistance and injury of recent bovine *Escherichia coli* O157 and non-O157 biotype 1 *Escherichia coli* isolates. *Journal of Food Protection*, 2004, 67:583–590.
90. Buchanan R.L, Bagi L.K. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* *International Journal of Food Microbiology*, 1994, 23:317-332.
91. Vimont A., Vernozy-Rozand C., Montet M.P., Lazizzera C., Bavai C., Delignette-Muller M.-L. Modeling and Predicting the Simultaneous Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and Ground Beef Background Microflora for Various Enrichment Protocols. *Applied And Environmental Microbiology*, 2006, 72(1):261–268.
92. Vold L., Holck A., Wasteson Y., Nissen H. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, 56:219–225
93. Hwang C.-A., Huang L. Dynamic analysis of competitive growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *Food Control*, 2018, 93: 251-259
94. Smith L., Mann J.E., Harris K., Miller M.F., Brashears M.M. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in ground beef using lactic acid

- bacteria and the impact on sensory properties. *Journal of Food Protection*, 2005, 68: 587-1592.
95. Kirsch K.R., Tolen T.N., Hudson J.C., Castillo A., Griffin D., Taylor T.M. Effectiveness of a Commercial Lactic Acid Bacteria Intervention Applied to Inhibit Shiga ToxinProducing *Escherichia coli* on Refrigerated Vacuum-Aged Beef. *International Journal of Food Science*, 2017:8070515.
96. Bingöl E.B., Bostan K. Effect of Sodium Lactate on the Microbiological Quality and Shelf Life of Sausages. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2007, 31(5): 333-339.
97. Bingöl E.B., Bostan K. Bir Gıda Katkı Maddesi Olarak Laktatların Et ve Et Ürünlerinde Kullanımı. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012, 38 (1):79-88.
98. Byrne C. M., Bolton D.J., Sheridan J.J., Blair I.S., McDowell D.A. Determination of the effect of sodium lactate on the survival and heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in two commercial beef patty formulations. *Food Microbiology*, 2002, 19: 211–219
99. Hsin-Yi, C., Chou C.-C. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 70:189–195.
100. Holck A.L., Axelsson L., Rode T.M., Høy M., Måge I., Alvseike O, L.' Abée-Lund T.M., Omer M.K., Granum P.E, Heir E. Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. *Meat Science*, 2011, 89:286-95.
101. Fite A., Dykhuizen R., Litterick A., Golden M., Leifert C. Effects of ascorbic acid, glutathione, thiocyanate, and iodide on antimicrobial activity of acidified nitrite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48:655–658.
102. Rao A., Jump R.L., Pultz N.J., Pultz M.J., Donskey C.J. In Vitro Killing of Nosocomial Pathogens by Acid and Acidified Nitrite. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2006, 50:3901.
103. Dykhuizen R.S., Frazer R., Duncan C., Smith C.C., Golden M., Benjamin N., Leifert C. Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: importance of dietary nitrate in host defense. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40:1422-1425.



104. Archer D.L. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *Journal of Food Protection*, 2002, 65:872–875.
105. Xu J., Xu X., Verstraete W. The bactericidal effect and chemical reactions of acidified nitrite under conditions simulating the stomach. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90:523–529.
106. Benjamin N. O’Driscoll F., Dougall H., Duncan C., Smith L., Golden M., McKenzie H. Stomach NO synthesis. *Nature*, 1994, 368:502;1994.
107. Casey, P., Condon S. Synergistic lethal combination of nitrite and acid pH on a verotoxin-negative strain of *Escherichia coli* O157. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55:255–258.
108. Pichner R., Hechelmann H, Steinrueck H., Gareis M. Shigatoxin-Producing *Escherichia Coli* (STEC) in Conventionally and Organically Produced Salami Products. *Fleischwirtschaft*, 2006, 86:112-114.
109. Soyutemiz G.E., Özenir A. Bursa’da tüketilen sucuk, salam, sosis ve pastirmalardaki kalıntı nitrat ve nitrit miktarlarının saptanması. *Gıda*, 1996, 21:471-476.
110. Leyer G.J., Wang L.L., Johnson E.A. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied Environmental Microbiology*, 1995, 61:3752–3755.
111. Kataoka A., Enache E., Sohail M., Elliott P. H., Black D. G. Inactivation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in single-strength lemon and lime juices containing preservatives. *Journal of Food Protection*, 2011, 74:1746–1750.
112. Rode T.M., McLeod A., Måge I., Heir E., Axelsson L., Holck A.L. Survival of Five Strains of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* in a Sausage Fermentation Model and Subsequent Sensitivity to Stress from Gastric Acid and Intestinal Fluid. *Hindawi International Journal of Microbiology*, 2017, Article ID 5176384.
113. Naim F., Messier S., Saucier L., Piette G. Postprocessing in vitro digestion challenge to evaluate survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented dry sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6637–6642.

114. Uljas H.E., Ingham S.C. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in synthetic gastric fluid after cold and acid habituation in apple juice or trypticase soy broth acidified with hydrochloric acid or organic acids. *Journal Food Protection*, 1998, 61, 939–947.
115. Carey C.M., Kostrzynska M., Thompson S. *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression on Romaine lettuce using comparative realtime PCR. *Journal of Microbiol Methods*, 2009, 77:235–242.
116. White-Ziegler C.A., Um S., Pérez N.M., Berns A.L., Malhowski A.J., Young S. Low temperature (23°C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, 2008, 154:148–166.
117. Battesti A., Majdalani N., Gottesman S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Reviews in Microbiology*, 2011, 65:189–213.
118. Baylis C.L., MacPhee S., Robinson A.J., Griffiths R., Liffey K., Betts R.P. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, O111:H and O26:H11 in artificially contaminated chocolate and confectionary products. *International Journal of Food Microbiology* 2004, 96:35–48.
119. Smith J.L., Fratamico P.M. Effect of stress on non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 2012, 75:2241–2250
120. Lin J., Smith M.P., Chapin K.C., Baik H.S., Bennett G.N., Foster J.W. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62:3094–3100.
121. Bhagwat A., Chan L., Han R., Tan J., Kothary M., Gean-Gilles J., Tall B.D. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes. *Infection and Immunity*, 2005, 73:4993–5003.
122. Zhu H., Hart C.A., Sales D., Roberts N.B. Bacterial killing in gastric juice effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, 55:1265-1270.
123. De Jonge R., Takumi K., Ritmeester W.S., van Leusden F.M. The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in an environment with changing pH. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94:555–560.
124. Russell T.L., Berardi R.R., Barnett J.L., Dermentzoglou L.C., Jarvenpaa K.M., Schmaltz S.P., Dressman J.B. Upper gastrointestinal pH in seventy-

nine healthy, elderly, North American men and women. *Pharmaceutical Research* 10, 1993, 187–196.

125. Rowe M.T., Kirk R. An investigation into the phenomenon of cross-protection in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 1999, 16:157–164.
126. Peterson W.L., Mackowiak P.A., Barnett C.A., Marling-Cason M., Haley M. L. The human gastric bactericidal barrier: mechanisms of action, relative antibacterial activity and dietary influences. *The Journal of Infectious Diseases*, 1989, 159:979–983.
127. Oliver J.D. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*. 2005, 43(1):93-100.
128. Yaron S., Matthews K.A. Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction Assay For Detection of Viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92:633-640
129. Pienaar J.A., Singh A., Barnard T.G. The viable but nonculturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review. *African Journal of Laboratory Medicine*, 2016, 5(1): a368.
130. Liu Y., Wang C., Tyrrell G., Li X. Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Water Research*, 2010, 44(3):711-718.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : S.Betül BOZATLI  
Doğum Yeri ve Yılı : Bozkır/KONYA, 1986  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : betul.kaya@cbu.edu.tr

### Eğitim Durumu

Lise : Orhan Dengiz Anadolu Lisesi (Uşak)  
Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2004-2008  
Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2008-2012

### Mesleki Deneyim

Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi 2010- (halen)

### Yayınları

Kaya S B, Tosun H, 2013. Occurence of Total Aflatoxin, Ochratoxin And Fumonisin in Some Organic Foods. Journal of Pure and Applied Microbiology. 7(4), p. 2925-2932

Kaya B, Ergönül B, 2014. Microbiological Attributes of Tahin (Sesame) Helva Sold under Market Conditions in Manisa. Journal of Pure And Applied Microbiology. 8(2), p. 927-929

Tosun H, Kaya B, 2010. Organik Gıdalarda Gıda Güvenliği. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 5(2) 48-58

Kaya B, Ergönül B. 2012. Manisa'da Açıkta Satışa Sunulan Tahin Helvaların Mikrobiyolojik Özellikleri. 3.Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 10-12 Mayıs 2012, Konya.

Bozatlı S.B., Dikici A. Survival and Acid Tolerance of Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) During Frankfurter Sausage Storage. 4th INTERNATIONAL CONGRESS on VETERINARY and ANIMAL SCIENCES, Nevşehir, 2018 (sözlü sunum)

Dikici A.,Bozatlı S.B. Microbiological Attributes of Vacuum Packed Frankfurters During Storage Obtained From Local Markets in İzmir. 4th INTERNATIONAL CONGRESS on VETERINARY and ANIMAL SCIENCES, Nevşehir, 2018 (sözlü sunum)

Bozatlı S.B., Dikici A. Survival of non-O157 STEC on Pilot Plant Produced and Vacuum Packed Frankfurters During Storage at 4°C. 4th INTERNATIONAL CONGRESS on VETERINARY and ANIMAL SCIENCES, Nevşehir, 2018 (poster bildiri)

Dikici A.,Bozatlı S.B. Microbiological load of frankfurters produced in pilot plant and stored at 4°C. 4th INTERNATIONAL CONGRESS on VETERINARY and ANIMAL SCIENCES, Nevşehir, 2018 (poster bildiri)